โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ สารในกลุ่มแซนโทนที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากกิ่งและก้านต้นติ้วแดง
Xanthones from the branches and twigs of *Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum* and their cytotoxicity

ชื่อนิสิต นายณัฐนันท์ วิจาระ เลขประจำตัว 5833031023
ภาควิชา เคมี
ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

สารในกลุ่มแซนโทนที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากกิ่งและก้านต้นติ้วแดง

Xanthones from the branches and twigs of Cratoxylum formosum subsp. pruniflorum and their cytotoxicity

โดย

นายณัฐนันท์ วิจาระ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

โครงการ สารในกลุ่มแซนโทนที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากกิ่งและก้านต้นติ้วแดง

โดย นางสายณัฐนันท์ วิจาระ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์)

....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ดวงกมล ตุงคะสมิต)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

....หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ .28. เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562

ชื่อโครงการ สารในกลุ่มแซนโทนที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากกิ่งและก้านต้นติ้วแดง

ชื่อนิสิตในโครงการ นายณัฐนันท์ วิจาระ เลขประจำตัว 5833031023

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของกิ่งและก้านติ้วแดงมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี พบว่า แยกได้สารใหม่ในกลุ่มแซนโทน (xanthone) 1 ชนิด คือ Prunixanthone (**CF-08**) นอกจากนี้พบสารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 7 ชนิด คือ Buchanaxanthone (**CF-01**), Madagascin (**CF-02**), Vismiaquinone (**CF-03**), Cratoxyarborenone F (**CF-04**), 1,4,7-Trihydroxyxanthenone (**CF-05**), Macluraxanthone (**CF-06**) และ 1,7-dihydroxy-5,6-dimethoxyxanthone (**CF-07**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 พบว่าสาร **CF-06** และ **CF-08** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 ในระดับดีโดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 1.94-11.83 μM

คำสำคัญ: ติ้วแดง, แซนโทน, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Project Title Xanthones from the branches and twigs of *Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum* and their cytotoxicity

Student Name Mr. Natthanan Vijara Student ID 5833031023

Advisor Name Associate Professor Santi Tip-pyang, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2018

Abstract

A new xanthone, named Prunixanthone (**CF-08**), along with seven known compounds, Buchanaxanthone (**CF-01**), Madagascin (**CF-02**), Vismiaquinone (**CF-03**), Cratoxyarborenone F (**CF-04**), 1,4,7-Trihydroxyxanthenone (**CF-05**), Macluraxanthone (**CF-06**) and 1,7-dihydroxy-5,6-dimethoxyxanthone (**CF-07**), were isolated from the branches and twigs of *Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum*. Their structures were determined by spectroscopic analysis as well as comparison with the previously published data. All isolated compounds were evaluated for their cytotoxicity against KB, HeLa S-3 and HepG2 cell lines. Compounds **CF-06** and **CF-08** showed good cytotoxicity against KB, Hela S-3 and HepG2 cell with IC_{50} values in the range of 1.94-11.83 μM.

Keywords: *Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum*, xanthones, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์สันติ ทิพยางค์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาสละเวลา ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. เฟื่องฟ้า อุ่นอบ และ อาจารย์ ดร. ดวงกมล ตุงคะสมิต ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยตระหนักถึง ความตั้งใจและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณ Edwin Risky Sukandar ภาควิชาเคมี ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา แนะแนวทาง เทคนิคการวิจัย เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดจนการปรับปรุงและตรวจสอบรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนบางส่วนในการทำวิจัย รวมทั้งรุ่นพี่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรทางการศึกษา และผู้สนใจทั่วไปมากก็น้อย

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอนุมัติ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญแผนภาพ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นติ้วแดง	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	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
2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	8
2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)	9
2.5.3 Sephadex LH-20 (Column Chromatography)	9
2.5.4 Radical chromatograph โครมาโทรอน (Chromatotron®)	10
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	11
2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	11
2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ	11
2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method 13

บทที่ 3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ 15

3.1.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-08** 15

3.1.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-01** 17

3.1.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-02** 17

3.1.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-03** 18

3.1.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-04** 18

3.1.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-05** 19

3.1.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-06** 19

3.1.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CF-07** 20

3.1.9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 20

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 22

ข้อเสนอแนะ 23

เอกสารอ้างอิง 24

ภาคผนวก 26

ประวัติผู้วิจัย 30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR (400 MHz) และ^{13}C-NMR (100 MHz) ของสาร **CF-08** 16

ตารางที่ 3.2 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**CF-01-CF-08**) และสารมาตรฐาน Doxorubicin 20

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ลักษณะของลำต้น และดอกของต้นติ้วแดง	2
รูปที่ 1.2 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วแดง	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วแดง	3
รูปที่ 1.4 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลำต้นของติ้วแดง	4
รูปที่ 1.5 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบของติ้วแดง	4
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสาร **CF-08**	15
รูปที่ 3.2 ข้อมูล HMBC (ลูกศรหัวเดียว) และ COSY (เส้นทึบ) ของโครงสร้าง **CF-08**	16
รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสาร **CF-01**	17
รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร **CF-02**	17
รูปที่ 3.5 โครงสร้างของสาร **CF-03**	18
รูปที่ 3.6 โครงสร้างของสาร **CF-04**	18
รูปที่ 3.7 โครงสร้างของสาร **CF-05**	19
รูปที่ 3.8 โครงสร้างของสาร **CF-06**	19
รูปที่ 3.8 โครงสร้างของสาร **CF-07**	20
รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารที่แยกได้ **CF-01-CF-08**	22

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของกิ่งและก้านติ้วแดง 14

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
รูปที่ 1 สเปกตรัม 1H-NMR ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*	27
รูปที่ 2 สเปกตรัม 13C-NMR ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*	27
รูปที่ 3 สเปกตรัม COSY ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*	28
รูปที่ 4 สเปกตรัม HSQC ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*	28
รูปที่ 5 สเปกตรัม HMBC ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*	29

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

UV	ultraviolet
NMR	nuclear magnetic resonance
TLC	thin layer chromatography
IC_{50}	the half maximal inhibitory concentration
μg/ml	microgram per milliliter
μM	micromolar
μL	microliter
L	Liter
M	molar
J	coupling constant (Hz)
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
s	singlet (NMR)
d	doublet (NMR)
t	triplet (NMR)
dd	doublet of doublets (NMR)
m	multiplet (NMR)
m/z	mass per charge number of ions (mass spectroscopy)
HRESIMS	high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
δ_H	chemical shift of proton (NMR)
δ_C	chemical shift of carbon (NMR)
$CDCl_3$	deuterated chloroform
^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
^{13}C-NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	correlation spectroscopy
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันเป็นยุคที่ประชากรมีอายุเฉลี่ยสูงขึ้น ส่งผลให้มีจำนวนผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้นทุก ๆ ปี ซึ่งในปัจจุบันทางการแพทย์ได้มีการคิดค้นและพัฒนาวิธีการรักษา เพื่อใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคที่เกิดจากเชื้อจุลิทรีย์บางชนิด โรคมะเร็ง เป็นต้น [1] จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นทำให้มีการพัฒนายารักษาโรคมากขึ้น มีทั้งยาที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและการสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันนั้นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ถูกนำมาเป็นยารักษาโรคอย่างแพร่หลาย [2] เนื่องจากสารเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยมากเมื่อเทียบกับสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้วิจัยได้ทำการสืบค้นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชชนิดต่าง ๆ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ พบว่าต้นติ้วแดงหรือติ้วขน (*Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum*) มีองค์ประกอบทางเคมีหลักเป็นสารประกอบในกลุ่ม แซนโทน (xanthones) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น antioxidant, antimicrobial ได้แก่ Formoxanthone A และ Formoxanthone C เป็นต้น และมีฤทธิ์ต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งชนิด KB เช่น **β**-mangostin และ Gerontoxanthone I เป็นต้น [3,4,5] อีกทั้งยังทำให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาความก้าวหน้าของยารักษาโรค

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากพืช และนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB, Hela S-3 และ HepG2 เป็นต้น หรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่เหมาะสม โดยพืชที่ผู้วิจัยเลือกทำการศึกษา คือ ส่วนกิ่งและก้านของติ้วแดง

1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นติ้วแดง

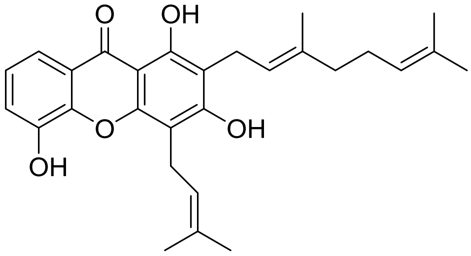
ต้นติ้วแดงหรือติ้วขน (*Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Clusiaceae* สามารถพบได้ตามป่าเบญจพรรณแล้งทุกภาค ที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 200-1000 เมตร มีลักษณะเป็นไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ผลัดใบ สูง 8-15 เมตร เปลือกนอกสีน้ำตาลปนดำ แตกเป็นสะเก็ดตามยาว เปลือกในสีน้ำตาลเหลืองและมียางเหนียว ๆ สีเหลืองปนแดง เรือนยอดเป็นพุ่มกลม โปร่ง กิ่งเล็กตามลำต้น มักกลายสภาพเป็นหนามแข็ง ๆ ใบ เป็นใบเดี่ยว ติดตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ หรือรูปขอบขนานกว้าง 2.5-4.5 เซนติเมตร ยาว 3-13 เซนติเมตร โคนใบสอบเรียว เนื้อใบบาง หลังใบมีขนสากๆส่วนท้องใบมีขนนุ่มหนาแน่น ใบอ่อนออกสีชมพูเรื่อ ใบแก่ก่อนผลัดใบมีสีแดง ขอบใบเรียบ ดอก สีชมพูอ่อนถึงแดง กลิ่นหอมอ่อนๆ ออกเป็นกระจุกตามกิ่ง ทั้งกลีบรองกลีบดอกและกลีบดอก มีอย่างละ 5 กลีบ กลีบรองกลีบดอกมีขนประปรายส่วนกลีบดอกเกลี้ยงและยาวประมาณ 2 เท่า ของกลีบรองกลีบดอก เกสรผู้มีมาก และแบ่งเป็น 3 กลุ่ม รังไข่รูปรี ๆ เกลี้ยง ผล เป็นชนิดผลแห้ง รูปรี ๆ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แข็งมีคราบสีนวลๆตามผิว ผลแก่จัดจะแตกอ้าออกเป็น 3 แฉก สีน้ำตาล เมล็ด รูปขอบขนานเล็กมีปีกโค้ง [6]

รูปที่ 1.1 ลักษณะดอกและลำต้นของต้นติ้วแดง

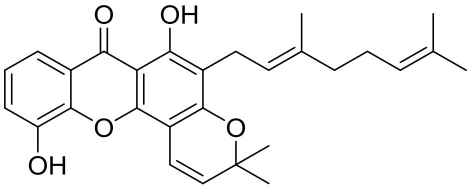
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของพืช *Cratoxylum formosum* subsp. *pruniflorum* ส่วนใหญ่จะพบสารในกลุ่ม xanthones, flavonoids และ anthraquinones ดังรายงานต่อไปนี้

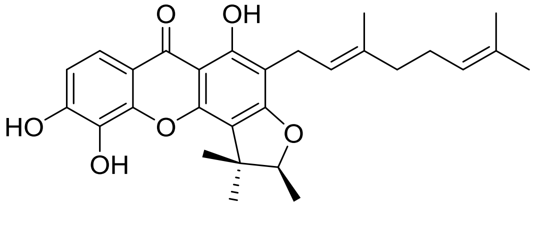
Sompong และคณะ (2006) [4] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนรากไม้ด้วยแฮกเซน พบสารใหม่ 3 ชนิด คือ Formoxanthone A, Formoxanthone B, Formoxanthone C ดังรูปที่ 1.2 หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์การต้านการแบคทีเรีย พบว่า Formoxanthone C มีฤทธิ์ความเป็นพิษสูงต่อเซลล์แบคทีเรีย (*B. substilis*) มีค่า IC_{50} < 4.6 μg/ml



Formoxanthone A



Formoxanthone B

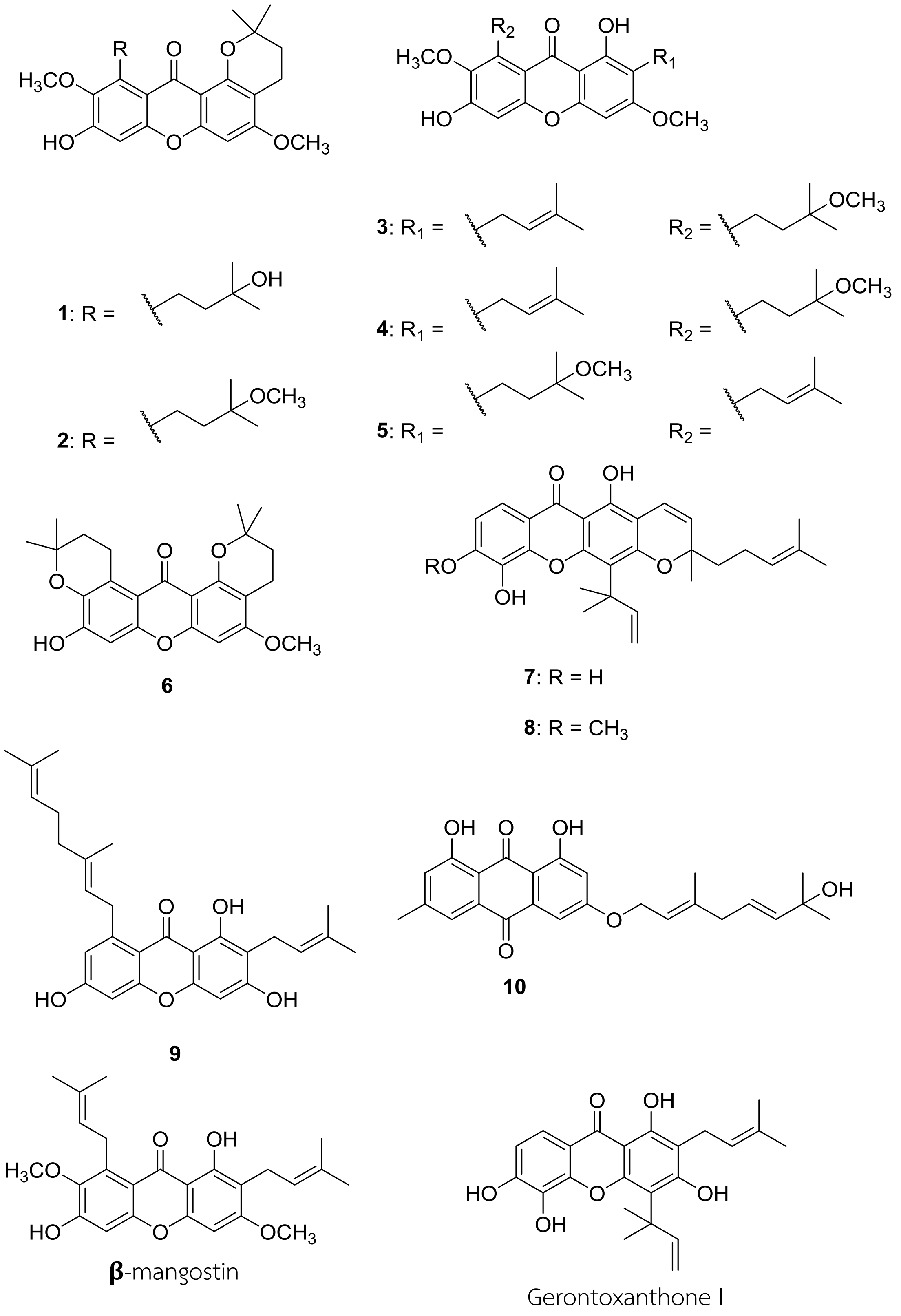


Formoxanthone C

รูปที่ 1.2 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วแดง

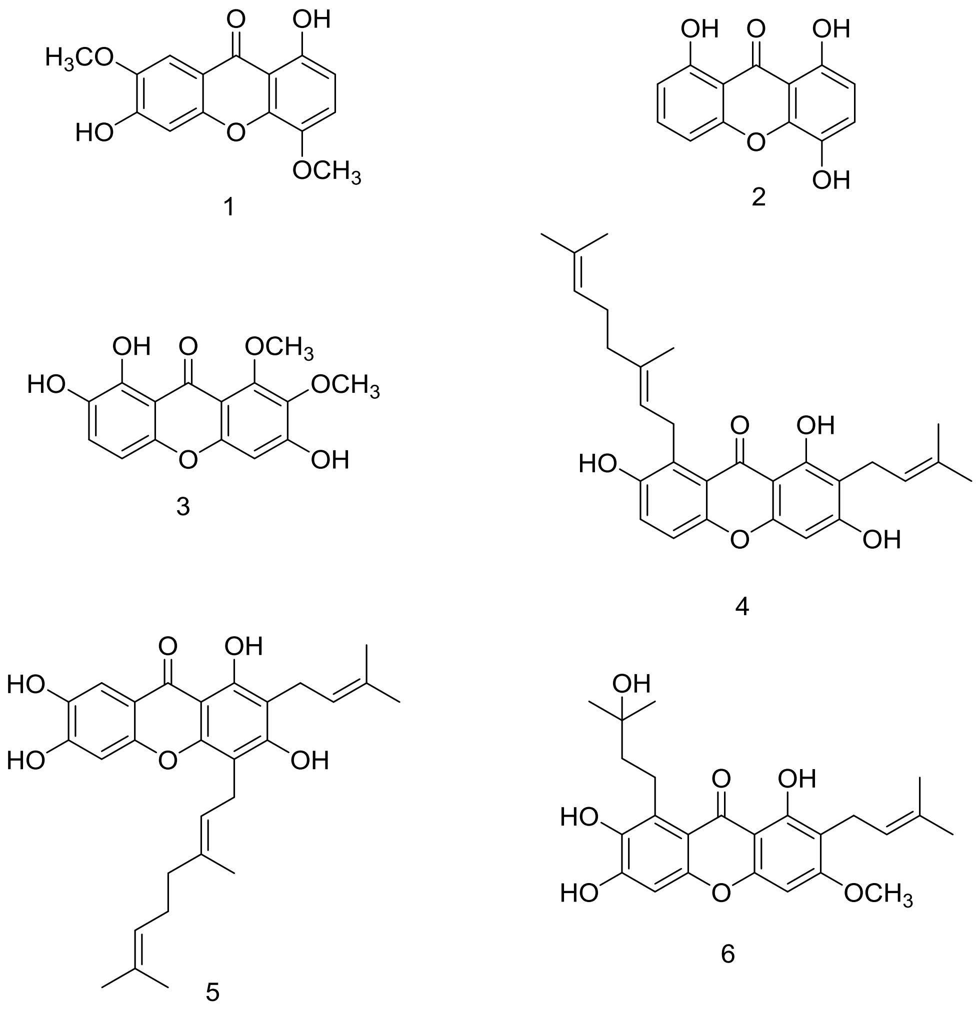
Nawong และคณะ (2006) [5] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนรากไม้ด้วยไดคลอโรมีเทน พบสารใหม่ 10 ชนิด คือ pruniflorone A-J (**1-10**) ดังรูปที่ 1.3 และสารที่ทราบแล้ว 2 ชนิด คือ **β**-mangostin และ Gerontoxanthone I หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า Gerontoxanthone I มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด MCF-7, HeLa, HT-29 และ KB มี

ค่า IC_{50} 0.6-0.7 µg/ml และพบว่า **β**-mangostin มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด MCF-7, HeLa, HT-29 และ KB มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.6-4.9 µg/ml



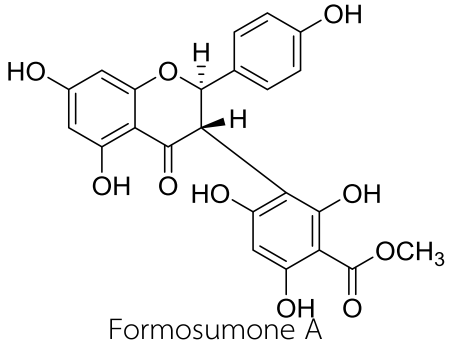
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วแดง

Duan และคณะ (2010) [7] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนลำต้นด้วยเอทานอล พบสารใหม่ 6 ชนิด คือ Pruniflorones M-R (**1**-**6**) ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลำต้นของติ้วแดง

Xiong และคณะ (2014) [8] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนใบไม้ด้วยเอทานอล พบสารใหม่ 1 ชนิด คือ Formosumone A ดังรูปที่ 1.5



Formosumone A

รูปที่ 1.5 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบของติ้วแดง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกิ่งและก้านติ้วแดง โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีด้วย ข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโทรเมตรีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี เป็นต้น รวมถึงนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าต้นติ้วแดง มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และมักมีการรายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ อีกทั้งในรายงานที่ผ่านมาพบว่าส่วนกิ่งและก้านติ้วแดงยังมีงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อย ทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งและก้านติ้วแดง และศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งของพืชชนิดนี้ โดยผู้วิจัยคาดว่าจะพบสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ ในทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์ต่อไป [9]

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งและก้านติ้วแดงให้บริสุทธิ์
2. พิสูจน์ทราบเอกลักษณ์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

กิ่งและก้านของต้นติ้วแดงที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากจังหวัดมหาสารคาม เมื่อวันที่ 17 เดือน มิถุนายน ปี พ.ศ. 2560

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ (column)
2. บีกเกอร์ (beaker)
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
4. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
5. หลอดทดลอง (test tube)
6. กรวยแก้ว (glass funnel)
7. ช้อนตักสาร (spatula)
8. หลอดหยดสาร (dropper)
9. แท่งแก้วคนสาร (glass rod)
10. ขาตั้งและแคลมป์ (Stand & Clamp)
11. กระบอกตวง (Cylinder)
12. ไฮโดรมิเตอร์ (hydrometer)
13. กระดาษกรอง (filter paper)
14. หลอดคะปิลลารี (capillary tube)
15. ไมโครปิเปต (micropipette)
16. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
17. เครื่อง hot plate stirrer
18. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
19. เครื่อง Mass Spectrometer รุ่น Trio 2000
20. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer (Bruker®. 400 MHz)
21. UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ Short wave length = 254 นาโนเมตร และ Long wave length = 365 นาโนเมตร
22. เครื่อง radical chromatograph ยี่ห้อ โครมาโททรอน (Chromatotron®)

2.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) เอทิลอะซิเตท (EtOAc) เมทานอล (MeOH) อะซิโตน (Acetone) คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) คลอโรฟอร์มดี ($CDCl_3$) และอะซิโตน-ดิวเทอเรียม (acetone-*d6*)

2. ซิลิกาเจลเบอร์ 7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography เยอรมัน

4. Sephadex LH-20

5. Anisaldehyde reagent

6. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จัดหากิ่งและก้านติ้วแดง อุปกรณ์ และสารเคมี

2. นำกิ่งและก้านติ้วแดงมาสับและตากให้แห้ง บดให้มีขนาดเล็กลง สกัดด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 14 วัน

3. นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้ง (ระเหยตัวทำละลายออก) ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดด้วย thin layer chromatography (TLC)

4. แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น silica gel, sephadex LH-20 column chromatography และ radical chromatograph chromatotron เป็นต้น พร้อมศึกษาหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยแผ่น TLC หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ทำการแยกซ้ำโดยการเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่

5. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโทรเมตรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้วในฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ต

6. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2

7. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC) [10]

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets Silica gel 60 F254 ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการกำหนดระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต้มสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคะปิลลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรอง และมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุด (solvent front) ที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารโดยส่องด้วย UV Lamp ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในสารละลาย anisaldehyde/H_2SO_4 แล้วปิ้งบน hot plate อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

ก. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาด และมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การแต้มสาร นำแผ่น TLC มาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปด้านบน และขีดกำหนดระดับด้านล่างตรงตำแหน่งที่ต้องการแต้มสารจากนั้นใช้หลอด คะปิลลารีจุ่มลงไปในสารละลายที่ต้องการทดสอบ แล้วแต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นที่ใช้ ดินสอขีดไว้ ให้เป็นจุดวงกลมเล็ก ๆ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตร และแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร หลังจากที่จุดสารที่แต้มแห้งสนิทแล้วจึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้ว ทั้งนี้ระดับของจุดสารบน TLC ควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อยจากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อย ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ใช้ดินสอขีดไว้แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร

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

2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography) [11]

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

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่แยกประมาณ 20 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก กล่าวคือในตอนแรกต้อง ทำการเขย่าของผสมระหว่างซิลิกาเจลกับตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึง ค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการ และระดับซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกา เจล แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดควรระเหยตัวทำละลายให้เกือบแห้ง แล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจลเบอร์ 7734 โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไป บดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ในการคลุกกับสารที่ต้องการแยก ให้นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้งก่อนใส่คอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ เติมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลายด้านบนใส จากนั้น จึงเริ่มเปลี่ยนตัวทำละลายชนิดใหม่ต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.3 Sephadex LH-20 (Column Chromatography) [11]

เป็นเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเหลว ซึ่งเป็นการแยกสารให้บริสุทธ์ตามขนาดของ โมเลกุล ส่วนใหญ่ใช้ในการแยกของสารกลุ่ม steroids, terpenoids และ lipids เป็นต้น ตัวดูดซับ (Stationary Phase) คือ sephadex LH-20 ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก ใช้ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล คนตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อย ๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดตรงปลาย และมีตัวทำละลาย อยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เท sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ เพื่อให้ sephadex LH-20 อัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้ จนกระทั่งบรรจุ sephadex LH-20 ในระดับที่ต้องการ และระดับ sephadex LH-20 ไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับ sephadex LH-20 แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยละลายสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นใช้หลอดหยดดูดสารละลายที่ต้องการแยก แล้วบรรจุลงไปในคอลัมน์ และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลายด้านบนใส จากนั้นจึงเติมสารละลาย

1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.4 Radical chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron®) [12]

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ซึ่งจะมีหลักการ ทำงานคือ นำสารละลายของสารที่ต้องการแยกหยดลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้วย ซิลิกาเจลหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร ไขตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในกรวยแยก แล้วจึงเปิดเครื่องโดย แผ่นแก้วทรงกลมจะเกิดการหมุน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสาร ขึ้น ซึ่งจะมองเห็นได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมขณะทำการแยก แล้วทำการ เก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้ ดังนั้นข้อดีสำหรับเทคนิคนี้คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี กล่าวคือใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เนื่องจากแรงจากการหมุนเหวี่ยงจะช่วยทำให้ เกิดการแยกได้ดีและเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารที่แยกได้ทันทีโดยใช้ UV Lamp ทำให้ง่ายต่อการเก็บแฟรกชัน

ก. การเตรียมวัฏภาคนิ่ง ชั่งซิลิกาเจล หนัก 30 กรัม ผสมน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวจากนั้นนำไปเคลือบด้านบนแผ่นแก้วทรงกลม

ข. รอให้แผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลแห้งแล้วมาปรับความหนาของซิลิกาให้มีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร

ค. เปิดเครื่องโครมาโททรอนแล้วหยดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ขณะกำลังหมุน

ง. ปล่อยตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในเครื่องโครมาโททรอน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่น พร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นแถบสารที่แยกได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบน แผ่นแก้วทรงกลมและทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำกิ่งและก้านติ้วแดงมาสับและตากให้แห้ง (2.5 กิโลกรัม) บดให้มีขนาดเล็กลง สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 14 วัน ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีดำ

2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ

1. นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัดน้ำหนัก 19.54 กรัม

2. นำสิ่งที่สกัดได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลายผสม 0% ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซน จนถึง 100% ไดคลอโรมีเทนและ 0% เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 7 แฟรกชัน (1-7)

3. นำสารแต่ละแฟรกชัน (1-7) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

4. นำสารสกัดแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่ เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

5. นำแฟรกชัน 1 ที่ผ่านการแยก นำมาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วย ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 3 แฟรกชัน (1.1-1.3) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พบว่าแฟรกชัน 1.2 และ 1.3 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำแฟรกชัน 1.2 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 5% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-01**

7. นำแฟรกชัน 1.3 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 5% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-02** และ **CF-03**

8. นำแฟรกชัน 2-4 ที่ผ่านการแยก นำมาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วย ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 11 แฟรกชัน (2.1-2.3, 3.1-3.4 และ 4.1-4.4) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบ ด้วย TLC

โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตท เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าไม่มีแฟรกชันไหนที่น่าสนใจ

9. นำแฟรกชัน 5 ที่ผ่านการแยก นำมาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วย ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 7 แฟรกชัน (5.1-5.7) จากนั้นนำไปนระเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบ ด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 10% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน 5.6 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

10. นำแฟรกชัน 5.6 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-04**

11. นำแฟรกชัน 6 ที่ผ่านการแยก นำมาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วย ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 6 แฟรกชัน (6.1-6.6) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบ ด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 25% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน 6.1 6.5 และ 6.6 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

12. นำแฟรกชัน 6.1 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 15% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-05**

13. นำแฟรกชัน 6.5 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 15% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-06**

14. นำแฟรกชัน 6.6 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 15% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-07**

15. นำแฟรกชัน 7 ที่ผ่านการแยก นำมาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วย ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 3 แฟรกชัน (7.1-7.3) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบ ด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 10% เอทิลอะซิเตทต่อคลอโรฟอร์ม เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน 7.3 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

16. นำแฟรกชัน 7.3 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เอทิลอะซิเตทต่อคลอโรฟอร์ม จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึง นำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CF-08**

2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method [13]

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด KB, HeLa S-3 และ HepG2 ให้ได้ความเข้มข้น 3×10^3 เซลล์ ใน 200 µL ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งมี 5% ปริมาตรต่อปริมาตร fetal calf serum เป็นองค์ประกอบ

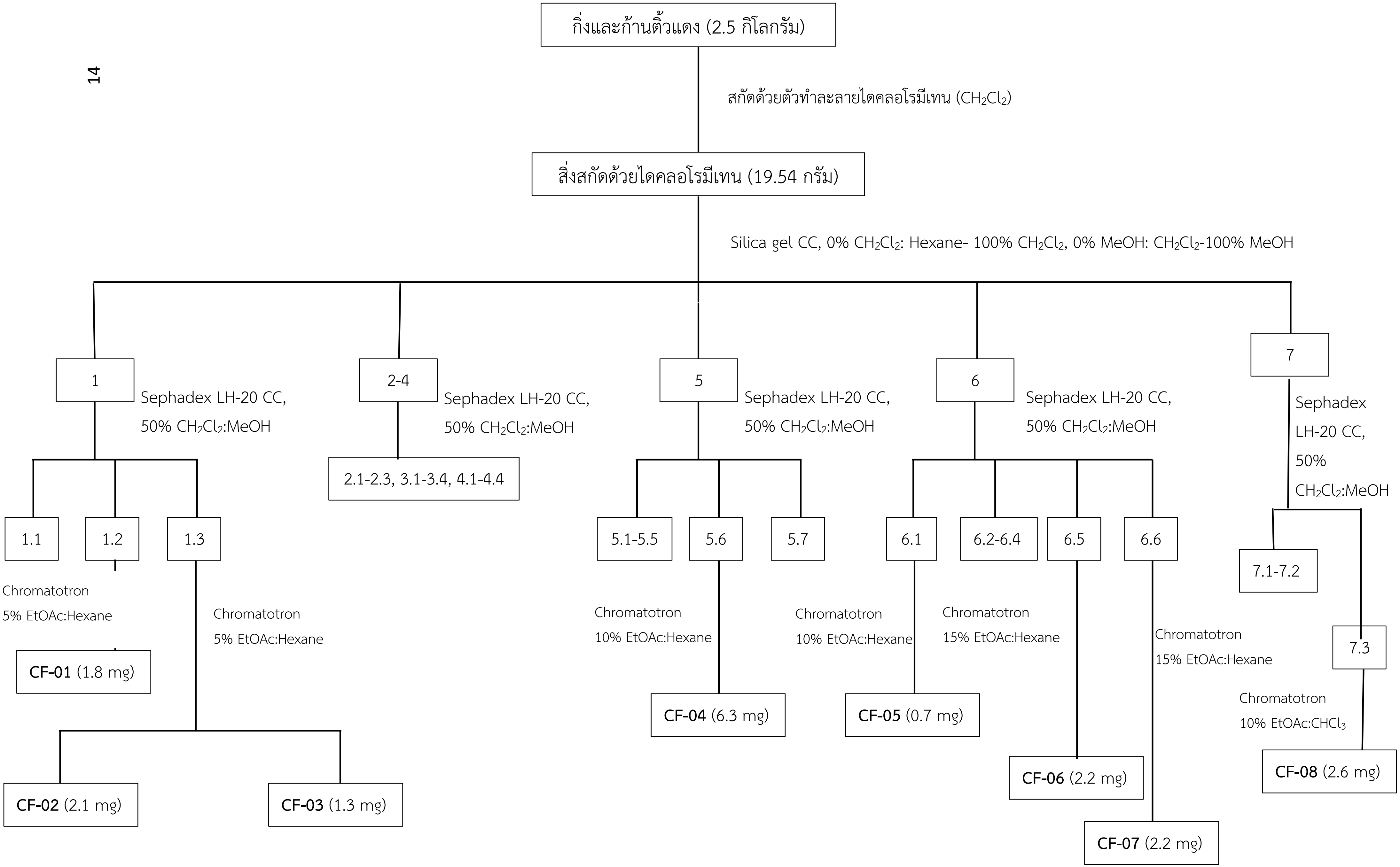
2. เติมเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไปใน 96-well culture plate

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

4. เติมสารบริสุทธิ์ที่ต้องการจะทดสอบและสารมาตรฐาน Doxorubicin ลงไปที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 2 µL ต่อ 1 หลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

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

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



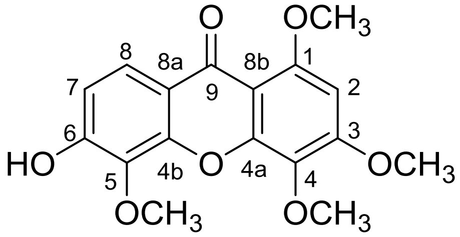
แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัดและแยกสารประกอบของกิ่งและก้านติ้วแดง

บทที่ 3

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

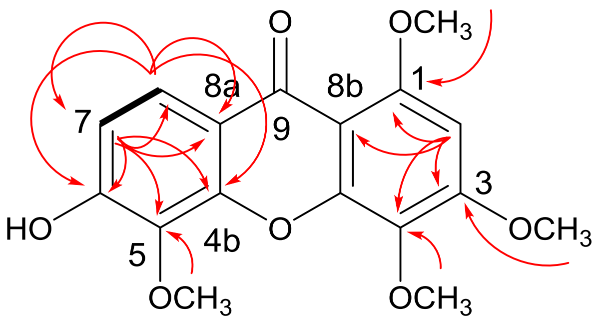
จากการทดลองพบว่าในการสกัดสารจากแฟรกชัน 1-7 ของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่งและก้านติ้วแดง พบว่าสามารถแยกสารทั้งหมด 9 ชนิด โดยเป็นสารใหม่ 1 ชนิด และสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว 8 ชนิด สำหรับการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จะอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอน (^{1}H-NMR) และคาร์บอน (^{13}C-NMR) กับสารที่เคยมีการ รายงานก่อนหน้านี้

3.1.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-08



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสาร **CF-08**

สาร **CF-08** ดังรูปที่ 3.1 ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลืองเข้ม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{17}H_{16}O_7$ จากการวัด HRESIMS พบไอออนพีคที่ (m/z) 407.1527 $[M-H]^+$ (จากการคำนวณ $C_{17}H_{16}O_7$ ได้ 407.1495) จาก ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) แสดงค่า chemical shift ที่ δ_H 4.03 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.96 (s, 3H) และ 3.90 (s, 3H) เป็นสัญญาณของหมู่ methoxy 4 หมู่ ที่ δ_H 6.03 (s, 1H) เป็นสัญญาณของหมู่ hydroxyl ที่ δ_H 7.30 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-7), 7.10 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-8) และ 6.65 (s, 1H, H-2) เป็นสัญญาณของโปรตอนวงอะโรมาติก จากข้อมูล HMBC ดังรูปที่ 3.2 และตารางที่ 3.1 ยังพบว่าตำแหน่ง H-2 (δ_H 6.03) มีความสัมพันธ์กับ C-1, C-3 และ C-4 ซึ่งเป็นคาร์บอนที่มีหมู่เมทท็อกซีเป็นหมู่แทนที่อยู่ จากข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร **CF-08** กับสาร 1,3,4,5,6-pentamethoxyxanthone [14] พบว่ามีความใกล้เคียงกัน ยกเว้นหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง C-6 ถูกแทนที่ด้วยหมู่ hydroxyl โดยการยืนยันของ ^{1}H NMR ที่ δ_H 6.03 (s, 1H) และ HRESIMS จึงสามารถยืนยันได้ว่ามีหมู่ hydroxyl อยู่จริง ดังนั้นสาร **CF-08** จึงเป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยให้ชื่อว่า Prunixanthone

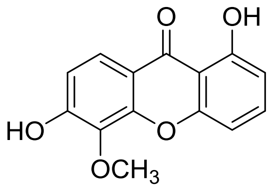


รูปที่ 3.2 ข้อมูล HMBC (ลูกศรหัวเดียว) และ COSY (เส้นทึบ) ของโครงสร้าง **CF-08**

ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR (400 MHz) และ ^{13}C-NMR (100 MHz) ของสาร **CF-08**

ตำแหน่ง	สาร CF-08 ($CDCl_3$)		
	δ_H	δ_C	HMBC
1	-	153.9	-
2	6.65 (s, 1H)	95.4	C-1, C-3, C-4, C-8b
3	-	158.7	-
4	-	139.4	-
4a	-	153.5	-
4b	-	150.1	-
5	-	144.4	-
6	-	145.6	-
7	7.30 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H)	121.2	C-4b, C-5, C-6, C-8, C-8a
8	7.10 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H)	113.2	C-4b, C-6, C-7, C-8a
8a	-	116.4	-
8b	-	111.1	-
9	-	174.9	-
6-OH	6.03 (s, 1H)	-	-
1-OCH_3	4.01 (s, 3H)	62.1	C-1
3-OCH_3	3.96 (s, 3H)	56.2	C-3
4-OCH_3	3.90 (s, 3H)	61.6	C-4
5-OCH_3	4.03 (s, 3H)	62.7	C-5

3.1.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-01

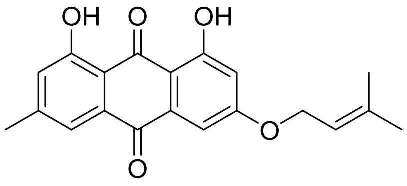


CF-01

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสาร **CF-01**

สาร **CF-01** ดังรูปที่ 3.3 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{14}H_{10}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$); δ_H 12.88 (s, 1H, 1-OH), 7.56 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-3), 7.43 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-8), 7.21 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-7), 6.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-4), 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-2), 5.98 (s, 1H, 6-OH), 4.04 (s, 3H, 5-OCH_3). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-01** กับสาร Buchanaxanthone พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-01** คือ Buchanaxanthone [15]

3.1.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-02

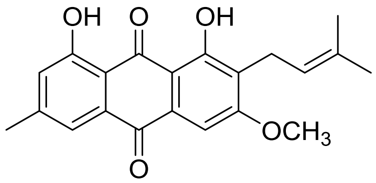


CF-02

รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร **CF-02**

สาร **CF-02** ดังรูปที่ 3.4 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีส้ม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{18}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$); δ_H 12.23 (s, 1H. 1-OH), 12.06 (s, 1H, 8-OH), 7.55 (s, 1H, H-5), 7.30 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-4), 7.01 (s, 1H, H-7), 6.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-2), 5.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.73 (d, *J* = 14.4 Hz, 6H). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-02** กับสาร Madagascin พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-02** คือ Madagascin [16]

3.1.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-03

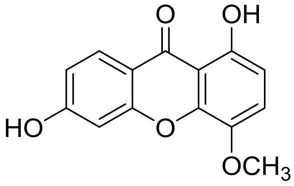


CF-03

รูปที่ 3.5 โครงสร้างของสาร **CF-03**

สาร **CF-03** ดังรูปที่ 3.5 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลืองเข้ม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$); δ_H 12.98 (s, 1H, 1-OH), 12.13 (s, 1H, 8-OH), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.44 (s, 1H, H-5), 7.10 (s, 1H, H-7), 6.95 (dd, *J* = 16.2, 7.1 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H, 3-OCH_3), 2.60 – 2.51 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 1.59 (s, 6H). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-03** กับสาร Vismiaquinone พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-03** คือ Vismiaquinone [17]

3.1.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-04

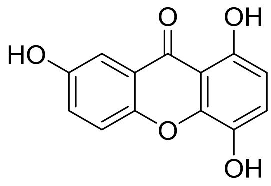


CF-04

รูปที่ 3.6 โครงสร้างของสาร **CF-04**

สาร **CF-04** ดังรูปที่ 3.6 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{14}H_{10}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-D6); δ_H 11.94 (s, 1H, 1-OH), 8.91 (s, 1H, 6-OH), 7.47 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-5), 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.32 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-7), 7.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-3), 6.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-2) , 3.82 (s, 3H, 4-OCH_3). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-04** กับสาร Cratoxyarborenone F พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-04** คือ Cratoxyarborenone F [18]

3.1.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-05

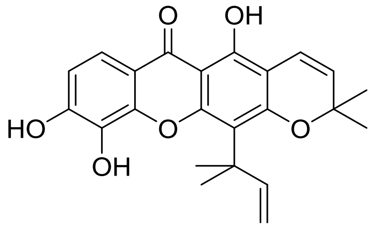


CF-05

รูปที่ 3.7 โครงสร้างของสาร **CF-05**

สาร **CF-05** ดังรูปที่ 3.7 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_8O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-D6); δ_H 11.96 (s, 1H, 1-OH), 7.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 7.44 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-3), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-2). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-05** กับสาร 1,4,7-Trihydroxyxanthenone พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-05** คือ 1,4,7-Trihydroxyxanthenone [19]

3.1.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-06

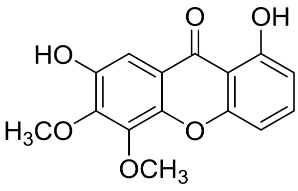


CF-06

รูปที่ 3.8 โครงสร้างของสาร **CF-06**

สาร **CF-06** ดังรูปที่ 3.8 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{22}O_6$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-D6); δ_H 13.93 (s, 1H, 1-OH), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-7), 6.71 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J* = 17.4, 10.6 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.98 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 1.50 (s, 6H). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-06** กับสาร Macluraxanthone พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-06** คือ Macluraxanthone [20]

3.1.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CF-07



CF-07

รูปที่ 3.9 โครงสร้างของสาร CF-07

สาร **CF-07** ดังรูปที่ 3.9 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{15}H_{12}O_6$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-D6); δ_H 13.28 (s, 1H, 1-OH), 7.61 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-3), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4), 6.78 (s, 1H, H-8), 6.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-2), 3.97 (s, 3H, 6-OCH_3), 3.91 (s, 3H, 5-OCH_3). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CF-07** กับสาร 1,7-dihydroxy-5,6-dimethoxyxanthone พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CF-07** คือ 1,7-dihydroxy-5,6-dimethoxyxanthone [21]

3.1.9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการนำสารทั้งหมด (**CF-01-CF-08**) ที่แยกได้โดยวิธีทางเทคนิคโครมาโทกราฟี มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ KB, Hela S-3 และ HepG2 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่าได้ผลตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**CF-01–CF-08**) และสารมาตรฐาน Doxorubicin

สาร	ค่า IC_{50} (μM)		
	KB	HelaS3	HepG2
CF-01	> 100	> 100	> 100
CF-02	> 100	96.34 ± 3.44	> 100
CF-03	21.36 ± 1.22	> 100	19.17 ± 2.93
CF-04	21.06 ± 0.61	76.67 ± 2.42	53.59 ± 9.07
CF-05	> 100	> 100	> 100
CF-06	1.94 ± 0.15	6.14 ± 0.10	4.95 ± 0.36
CF-07	> 100	> 100	> 100
CF-08	5.76 ± 0.17	8.71 ± 0.19	11.83 ± 0.72
Doxorubicin (sigma)	0.022 ± 0.001	0.144 ± 0.016	1.073 ± 0.163

$IC_{50} \leq 10$ = ฤทธิ์ดี $10 \leq IC_{50} \leq 30$ = ฤทธิ์ปานกลาง $30 \leq IC_{50} < 100$ = ฤทธิ์อ่อน และ
$IC_{50} \geq 100$ = ไม่มีฤทธิ์

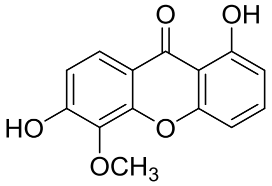
จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB พบว่า สาร **CF-06** และ **CF-08** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.94 และ 5.76 μM ตามลำดับ ส่วนสาร **CF-03** และ **CF-04** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.36 และ 21.06 μM ตามลำดับ **CF-01**, **CF-02**, **CF-05** และ **CF-07** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB โดยมี ค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM

จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 พบว่า สาร **CF-06** และ **CF-08** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.137 และ 8.707 μM ตามลำดับ ส่วนสาร **CF-02** และ **CF-04** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ในระดับอ่อน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 96.34 และ 76.67 μM ตามลำดับ **CF-01**, **CF-03**, **CF-05** และ **CF-07** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 โดยมี ค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM

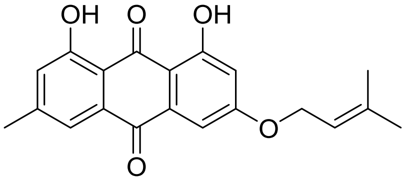
จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 พบว่า สาร **CF-06** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.95 ส่วนสาร **CF-03** และ **CF-08** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.17 และ 11.83 μM ตามลำดับ ส่วน **CF-04** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 ในระดับอ่อน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 53.59 μM **CF-01**, **CF-02**, **CF-05** และ **CF-07** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 โดยมี ค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

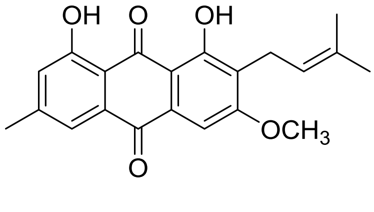
จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของกิ่งและก้านติ้วแดงมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี พบว่า แยกได้สารใหม่ในกลุ่มแซนโทน (xanthone) 1 ชนิด คือ Prunixanthone (**CF-08**) นอกจากนี้พบสารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 7 ชนิด คือ Buchanaxanthone (**CF-01**), Madagascin (**CF-02**), Vismiaquinone (**CF-03**), Cratoxyarborenone F (**CF-04**), 1,4,7-Trihydroxyxanthenone (**CF-05**), Macluraxanthone (**CF-06**) และ 1,7-dihydroxy-5,6-dimethoxyxanthone (**CF-07**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีร่วมกับการ เปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 พบว่าสาร **CF-06** และ **CF-08** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 1.94-11.83 μM สาร **CF-03** และ **CF-04** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 19.17-76.67 μM ส่วนสาร **CF-01**, **CF-02**, **CF-05** และ **CF-07** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM



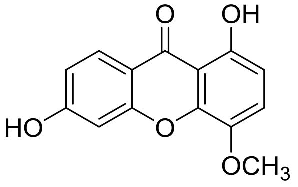
CF-01



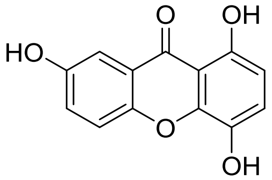
CF-02



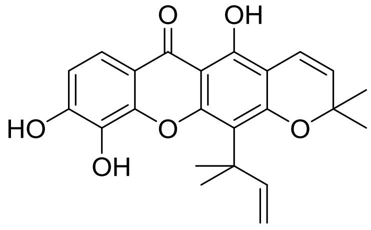
CF-03



CF-04

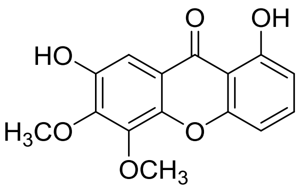


CF-05

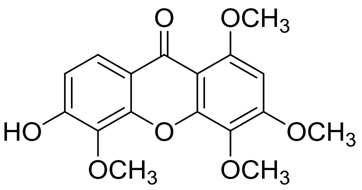


CF-06

รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารที่แยกได้ CF-01 – CF-08



CF-07



CF-08

รูปที่ 4.1(ต่อ) โครงสร้างของสารที่แยกได้ CF-01 – CF-08

ข้อเสนอแนะ

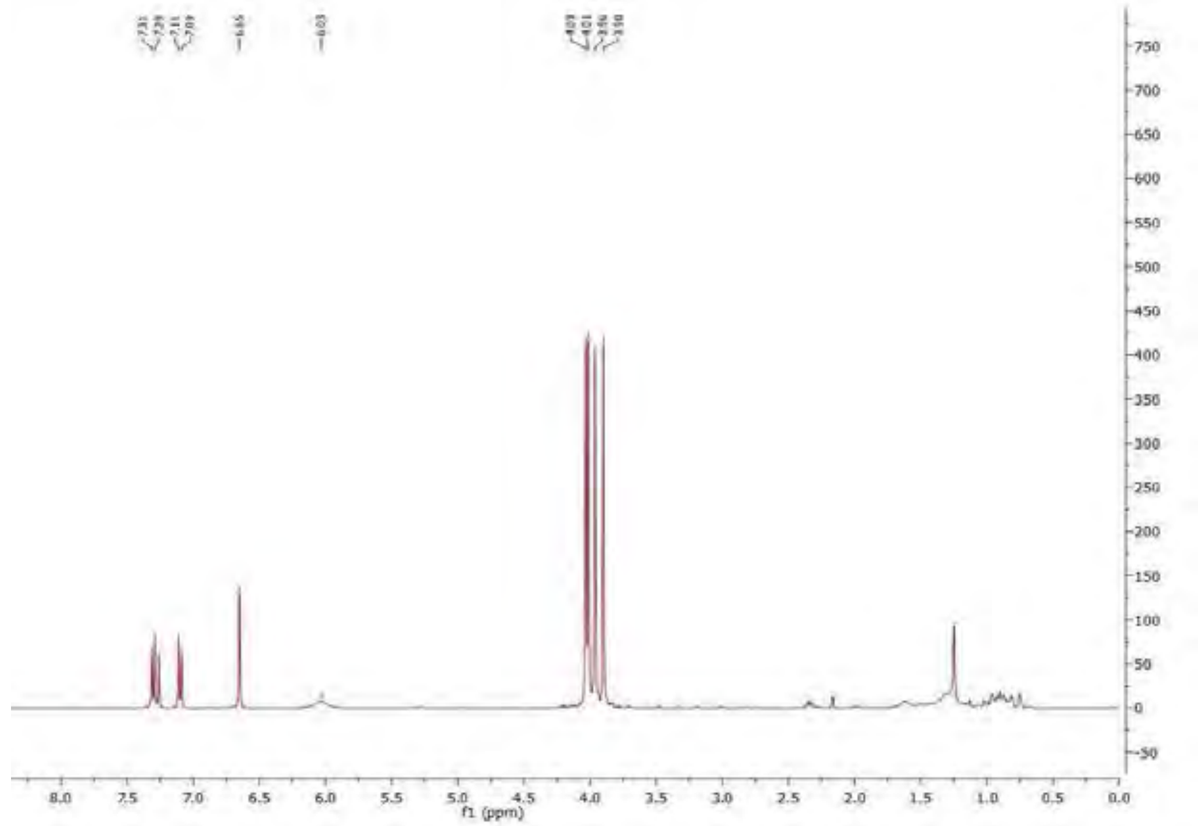
1. ในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้แยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเวลาที่จำกัดดังนั้นควรแยกในส่วนนี้อีกต่อไป
2. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนเพียงชนิดเดียวเพื่อการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และอาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดอื่นๆ เช่น เมทานอล, เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เป็นต้น
3. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจ

เอกสารอ้างอิง

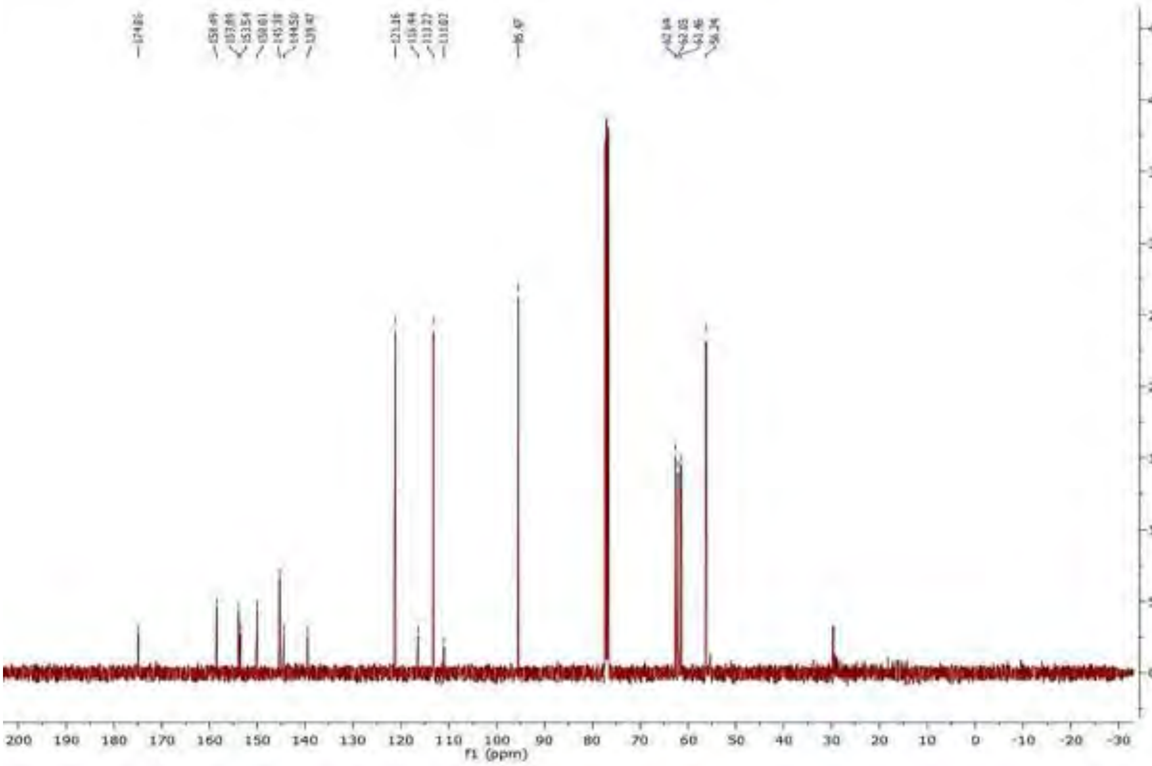
1. Cerreta, F., et al. (2018). "Medicines for older people: assessment and transparency at the European Medicines Agency regarding cardiovascular and antithrombotic medicinal products." *European Geriatric Medicine* **9**(4): 415-418.
2. Yuan, H., et al. (2016). "The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products." *Molecules* **21**(5): 559.
3. Raksat, A., et al. (2014). "Antibacterial Compounds from the Roots of *Cratoxylum formosum* spp. *Pruniflorum.*" *Nat. Prod. Commun.* **9**(10): 1487-1489.
4. Boonsri, S., et al. (2006). "Antibacterial and cytotoxic xanthones from the roots of *Cratoxylum formosum*." *Phytochemistry* **67**(7): 723-727.
5. Boonnak, N., et al. (2006). "Bioactive prenylated xanthones and anthraquinones from *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*." *Tetrahedron* **62**: 8850–8859.
6. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ [online] http://www.qsbg.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=810 (accessed 13 April 2019).
7. Duan, Y., et al. (2010). "Bioactive Xanthones from the Stems *of Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*." *J. Nat. Prod*. **73**(7): 1283-1287
8. Xiong, J., et al. (2014). "Phenolic constituents from the leaves of *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*." *Fitoterapia* **94**: 114-119.
9. Jiang, D., et al. (2004). "Pharmacological Effects of Xanthones as Cardiovascular Protective Agents." *Cardiovascular Drug Reviews* **22**: 91-102
10. Smith, I., et al. (1976). "b - Introduction To Paper And Thin-Layer Chromatography." *Paper and Thin Layer Chromatography (Fourth Edition)*: 5-11
11. Zhao, Y., et al. (2018). "Separation of aromatic monomers from oxidatively depolymerized products of lignin by combining Sephadex and silica gel column chromatography." *Separation and Purification Technology* **191**: 250-256
12. Desai, H. K., et al. (1985). "Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using the Chromatotron." *Journal of Chromatography A* **322**: 223-227
13. Kongkathip, N., et al. (2003). "Potent antitumor activity of synthetic 1,2-Naphthoquinones and 1,4-Naphthoquinones." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**: 3179-3191.
14. Ishiguro, K., et al. (1998). "A Xanthone From *Clusia Insi*gnis." *Phytochemistry* **49**(8): 2531-2532.
15. Dharmaratne, H. R., et al. (2009). "Xanthones from roots of *Calophyllum thwaitesii* and their bioactivity." *Nat Prod Res* **23**(6): 539-545.

16. Camele, G., et al. (1982). "2-Isoprenylemodin And 5,5'-Dimethoxysesamin From *Vismia Guaramirangae*." *Phytochemistry* **21**(2): 417-419.
17. Nagem, T. J. et al. (1997) "Xanthones and Other Constituents of *Vismia parviflora*." *J. Braz. Chem. Soc.* **8**(5): 505-508.
18. Seo, E. K., et al. (2002) "Cytotoxic Prenylated Xanthones and the Unusual Compounds Antraquinobenzophenones from *Cratoxylum sumatranum*." *J. Nat. Prod.* **65**: 299-305.
19. Iinuma, M., et al. (1996) "Two Xanthones From Roots of *Cratoxylum Formosa*nu." *Phytochemistry* **42**(4): 1195-1198.
20. Monache, F. D., et al. (1981) "Three new xanthones and macluraxanthone from *Rheedia benthamiana* Pl. Triana (guttiferae)." *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* ***0***: 484-488.
21. Tanaka, N. and Y. Takaishi (2006). "Xanthones from *Hypericum chinense*." *Phytochemistry* **67**(19): 2146-2151.

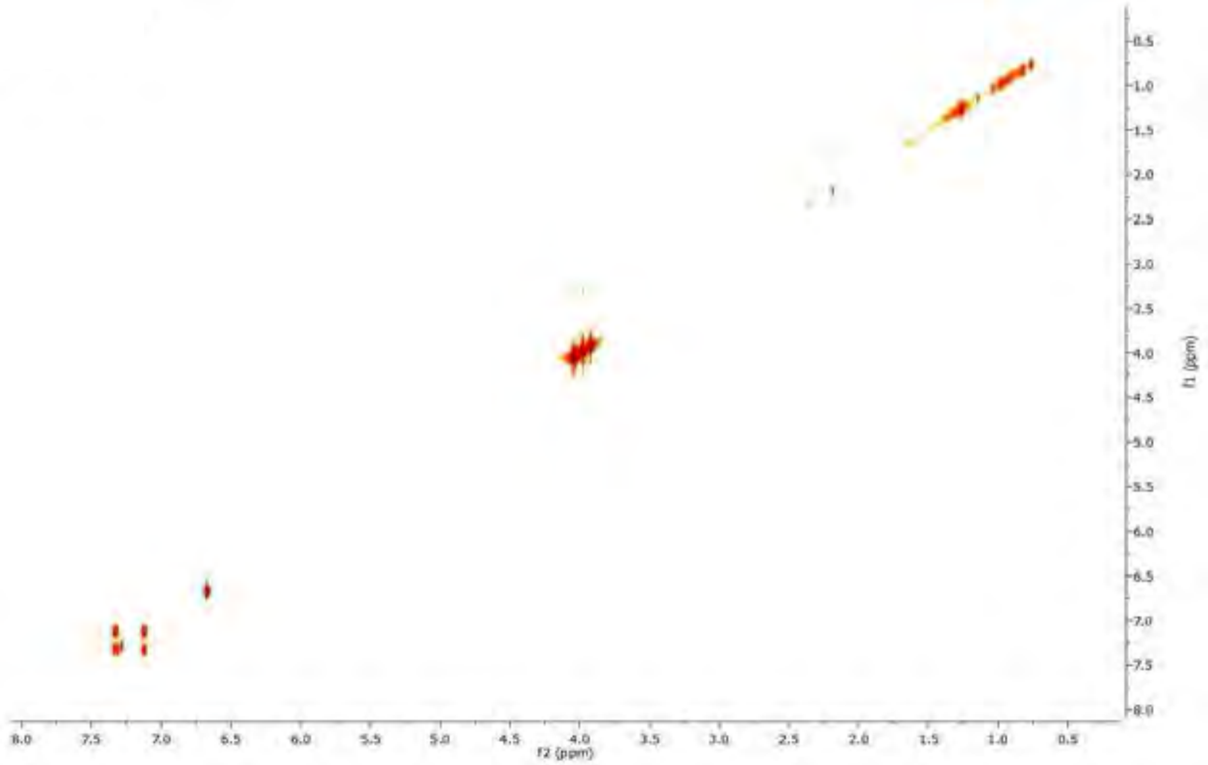
ภาคผนวก



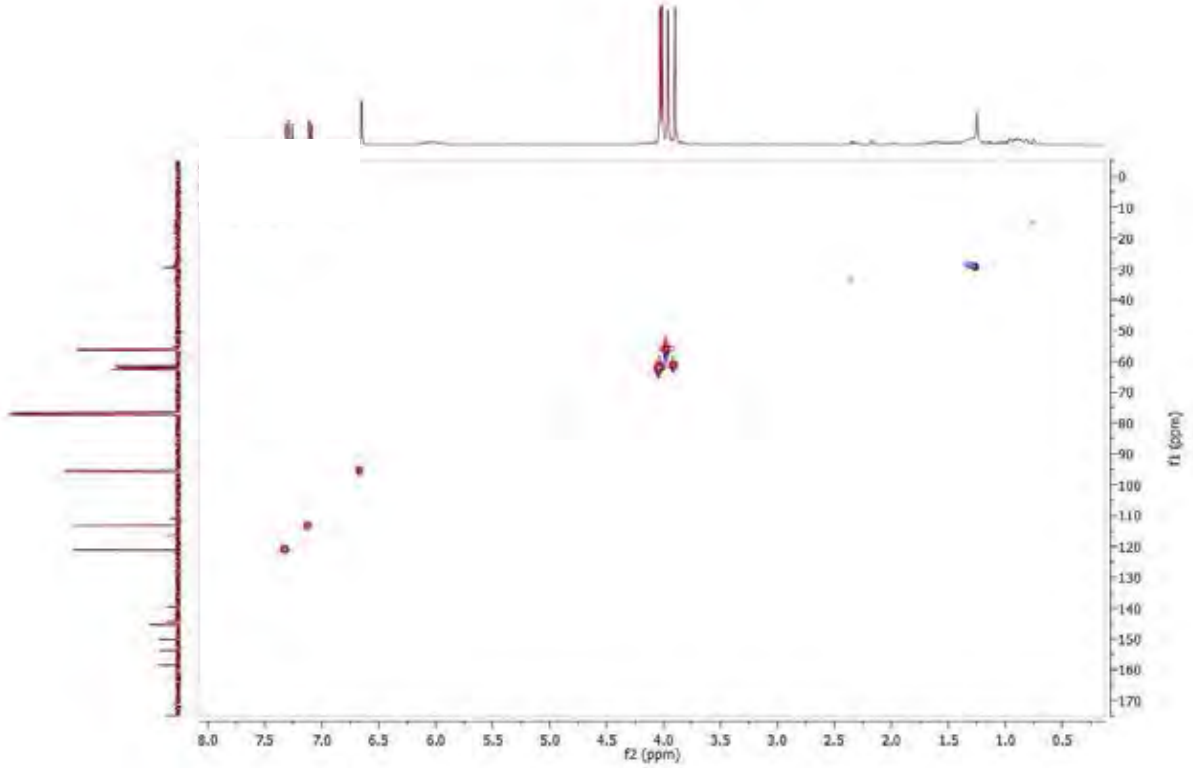
รูปที่ 1 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*



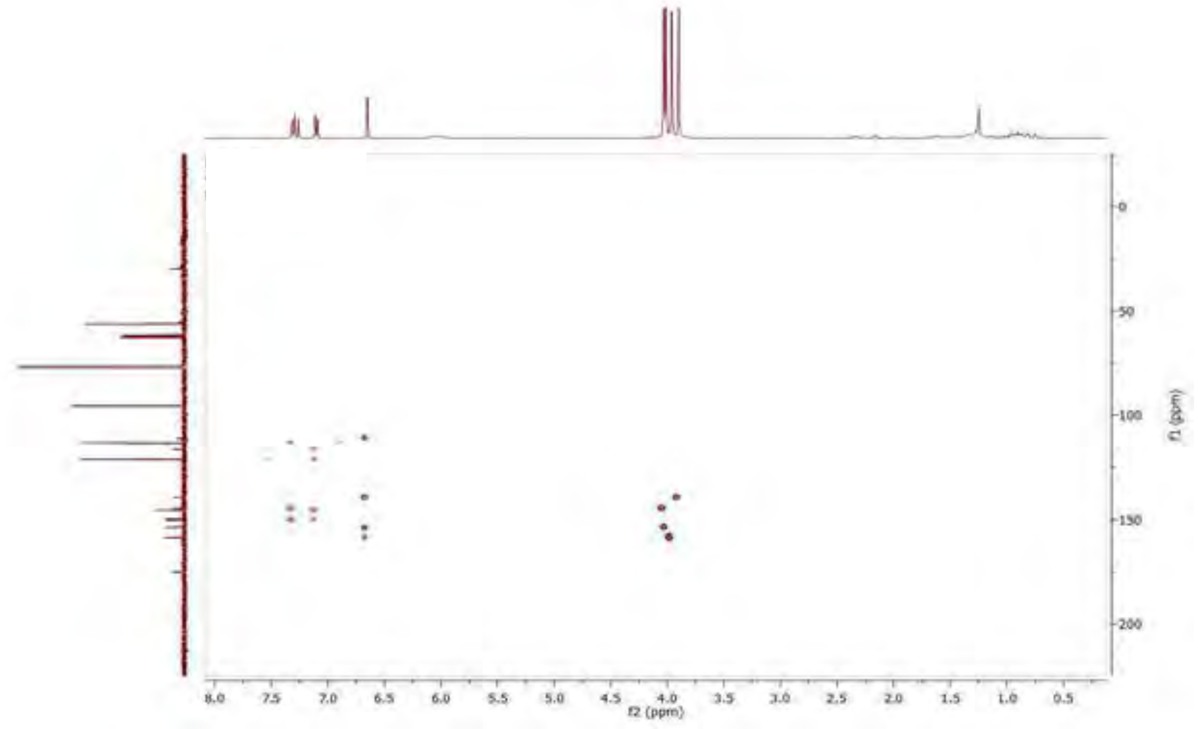
รูปที่ 2 สเปกตรัม ^{13}C-NMR ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*



รูปที่ 3 สเปกตรัม COSY ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*



รูปที่ 4 สเปกตรัม HSQC ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*



รูปที่ 5 สเปกตรัม HMBC ของ Prunixanthone (**CF-08**) ใน acetone-*d6*

ประวัติผู้วิจัย

นายณัฐนันท์ วิจาระ เกิดเมื่อวันที่ 11 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2540 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ จังหวัดจันทบุรี เมื่อปีการศึกษา 2557 เข้าศึกษา ต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2558 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 35/198 หมู่ที่ 1 ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี รหัสไปรษณีย์ 22000 โทร 094-4299662 อีเมล teety.tnk@gmail.com