

การศึกษาสารที่แยกได้จากส่วนที่เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด
จากต้นหลอดเถื่อน (*MALLOTUS OBLONGIFOLIUS* MUELL. ARG.)

ปริญญานิพนธ์

ของ

ทวัฒน์ ชูชนะกิจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สิงหาคม 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

615.312

ท ๖๖3.๕

๕.๖

การศึกษาสารที่แยกได้จากส่วนที่เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด
จากต้นหลอดเถื่อน (*MALLOTUS OBLONGIFOLIUS* MUELL. ARG.)

บทคัดย่อ

ของ

ทวัฒน์ ชูชนะกิจ

24 11 2547

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สิงหาคม 2547

h 25 11 2547

ทวัฒน์ ชูชนะกิจ. (2547). การศึกษาสารที่แยกได้จากส่วนที่เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็ง P-388

ของสารสกัดจากต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell. Arg.).

ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร

วิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : อาจารย์ ดร. จินดา แต่มบรรจง, ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ดร. สุรินทร์ ชัยชนะกุล, อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา.

หลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell. Arg.) เป็นสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่ใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่นอีก 6 ชนิดในตำรับยารักษามะเร็งตำรับหนึ่ง จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้จากส่วนที่เป็นพืช พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดหยาบ hexane และ CH_2Cl_2 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 64 และ 34 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบ hexane มาแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีพบสารประกอบใหม่ที่ไม่เคยพบมาก่อน 2 สารคือ $3\beta\text{-acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide}$ และ $12\text{-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0}^{4,6}\text{]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione}$ และสารที่เคยพบมาแล้วในหลอดเถื่อนจากการศึกษาที่ผ่านมา 1 สาร คือ $3\beta\text{-O-acetylaleuritic acid}$ สารประกอบใหม่ทั้งสองเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 มีค่า ED_{50} มากกว่า 100 และ 32 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้พบกลุ่มสารผสมอีก 3 กลุ่ม ที่แต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ 2 สาร คือ stigmasteran-3,6-dione กับ stigmaster-22-en-3,6-dione และ stigmaster-4-en-6 β -ol-3-one กับ stigmastera-4,22-dien-6 β -ol-3-one และ $3\beta\text{-hydroxy stigmaster-5-en-7-one}$ กับ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol สองกลุ่มแรกมีค่า ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารผสมของ $3\beta\text{-hydroxystigmaster-5-en-7-one}$ กับ 7-oxo-5,6-dihydro stigmasterol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 70 $\mu\text{g/mL}$ และกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอีกจำนวน 4 กลุ่มที่แต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันมากยังไม่สามารถแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ได้ กลุ่มสารผสมดังกล่าวมีค่า ED_{50} เท่ากับ 27 15 21 และ 23 $\mu\text{g/mL}$ ในส่วนของสารสกัด CH_2Cl_2 พบสารบริสุทธิ์ 3 สาร คือ stigmasterol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 43 $\mu\text{g/mL}$ และ aurantiamide acetate และ scopoletin มีค่า ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ และพบสารผสม 2 กลุ่ม คือ stigmaster-4-en-6 β -ol-3-one กับ stigmastera-4,22-dien-6 β -ol-3-one และ $3\beta\text{-hydroxy stigmaster-5-en-7-one}$ กับ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol และพบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างสูงอีกจำนวน 12 กลุ่มที่แต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีขั้วใกล้เคียงกันมากยังไม่สามารถแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ได้ มีค่า ED_{50} เท่ากับ 22 27 13 11 18 15 13 11

22 12 21 และ 16 $\mu\text{g/mL}$ สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี

A STUDY OF THE COMPOUNDS ISOLATED FROM CYTOTOXIC FRACTIONS ON P-388
CANCEROUS CELLS FROM *MALLOTUS OBLONGIFOLIUS* MUELL. ARG. EXTRACT

AN ABSTRACT
BY
TAWAT CHOUCANAKIJ

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
August 2004

Tawat Chouchanakij. (2004). *A Study of the Compounds Isolated from Cytotoxic Fractions on P-388 Cancerous Cells from Mallotus oblongifolius Muell. Arg. Extract*. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Dr. Chinda Tambunchong, Asst. Prof. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Porntipa Picha.

Mallotus oblongifolius Muell. Arg. has been used in a Thai traditional medicine with other seven herbs for anticancer. The crude extracts, chromatographic isolated fractions and pure isolated compounds were tested for cytotoxicity against P-388 leukemic cells. It was found that the ED₅₀ values of the hexane and CH₂Cl₂ crude extracts were 64 and 34 µg/mL respectively. By using chromatographic techniques, in hexane crude extract, two new compounds were found, which were 3β-acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide and 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo [12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione and a known compound which found from the former study, 3β-O-acetylaleuritolic acid was also isolated. The ED₅₀ of the two new compounds were greater than 100 µg/mL and 32 µg/mL respectively. Beside those, there were three groups of binary mixture, which were stigmastan-3,6-dione and stigmast-22-en-3,6-dione, stigmast-4-en-6β-ol-3-one and stigmasta-4,22-dien-6β-ol-3-one, and 3β-hydroxystigmast-5-en-7-one and 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol were isolated. The first two mixtures had ED₅₀ against P-388 leukemic cells over 100 µg/mL where as the mixture of 3β-hydroxystigmast-5-en-7-one and 7-oxo-5,6-dihydrostigma sterol had ED₅₀ equal to 70 µg/mL and other four groups of mixture which could not be purified due to the similarity in polarity, these groups of mixture had ED₅₀ against P-388 leukemic cells equal to 27, 15, 21 and 23 µg/mL. From CH₂Cl₂ crude extract, three pure compounds, stigmasterol with ED₅₀ values of 43 µg/mL, aurantiamide acetate and scopoletin with ED₅₀ values over 100µg/mL were obtained. Two groups of binary mixture which were stigmast-4-en-6β-ol-3-one and stigmasta-4,22-dien-6β-ol-3-one, and 3β-hydroxystigmast-5-en-7-one and 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol and other twelve fractions of mixture which could not be identified due to the similarity in polarity but relatively high toxic to P-388 leukemic cells with ED₅₀ of 22, 7, 13, 11, 18, 15, 13, 11, 22,

12, 21 and 16 $\mu\text{g/mL}$ were also isolated. The structures of compounds were elucidated by the spectroscopic techniques.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสารที่แยกได้จากส่วนที่เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด
จากต้นหลอดเถื่อน (*MALLOTUS OBLONGIFOLIUS* MUELL. ARG.)

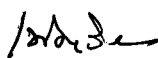
ของ

นายวัฒน์ ชูชนะกิจ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)

วันที่ .. เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์



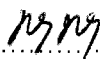
..... ประธาน

(อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง)



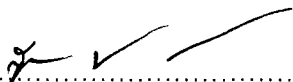
..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนະกุล)



..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชชา)



..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาลิทธิกุล)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือ แนะนำ และให้ความอนุเคราะห์จากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. จินดา เต็มบรรจง ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล และ ดร. พรทิพา พิชากรรณการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสัทธิตกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร ที่ได้ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย และให้สมุนไพรมานำในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัย พร้อมทั้งขอขอบพระคุณ คุณสุชานุช อ่อนดี และคุณจรัญญา งามขำ นักวิจัยที่กรุณาเตรียมเซลล์มะเร็งและวัสดุอุปกรณ์ ให้คำแนะนำช่วยเหลือและถ่ายทอดวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูลทางแมสสเปกโตรเมตรี ขอขอบพระคุณ ดร.หรรษา ประวัติ และคุณวิไลลักษณ์ ปรัชญาวรากร ในการให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์โครงสร้างสาร

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อนักศึกษาปริญญาโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ ที่เกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่มารดา บิดา ครูอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ทวัฒน์ ชูชนะกิจ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ความสำคัญของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
นิยามศัพท์เฉพาะ	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรต้านมะเร็ง	6
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีฤทธิ์ทางชีวภาพของ	
สารสกัดในพืชสกุล Mallotus	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
พืชที่ใช้ในการวิจัย	18
เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย	18
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	18
การสกัดสารจากส่วนของลำต้นหลอดเถื่อน	19
การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัด.....	20
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง P-388	21
4 ผลการวิจัย	24
ผลการสกัดสารจากลำต้นหลอดเถื่อน	24
ผลการแยกสารสกัด hexane และทำสารให้บริสุทธิ์	24
ผลการแยกสารสกัด CH ₂ Cl ₂ และทำสารให้บริสุทธิ์	32
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388	43
การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์	70

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5	
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	115
ข้อเสนอแนะ	119
บรรณานุกรม	121
ภาคผนวก	128
ประวัติย่อผู้วิจัย	192

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลการแยกสารสกัด hexane	24
2	ผลการแยกสารกลุ่ม H11.....	25
3	ผลการแยกสารกลุ่ม H13.....	26
4	ผลการแยกสารกลุ่ม H13.4.....	27
5	ผลการแยกสารกลุ่ม H14.....	28
6	ผลการแยกสารกลุ่ม H15.....	29
7	ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2	33
8	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.....	34
9	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.1	34
10	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2	35
11	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2.3	36
12	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2.4	37
13	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2.5	37
14	ผลการแยกสารกลุ่ม D5.3	38
15	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2	43
16	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารสกัด hexane	45
17	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ A และ B	46
18	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H13	48
19	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม H13	49
20	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H13.3	50
21	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม H13.4	51
22	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม H13.4	52

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
23	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ C	54
24	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม H14	54
25	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ D และ E	55
26	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ F	57
27	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2	58
28	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม D5	59
29	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ G	59
30	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม D5.2	61
31	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ I	61
32	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม D5.2.3	62
33	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม D5.2.4	64
34	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม D5.2.5	66
35	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ K	68
36	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก สารกลุ่ม D5.3	68
37	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A	70
38	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ B	71
39	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B	72

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
40	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B1 และ B2.....	74
41	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ C	78
42	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ C	79
43	ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ C	80
44	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ D	78
45	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร D	84
46	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ D1 และ D2.....	86
47	ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ D	87
48	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ E	90
49	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร E	91
50	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ E1 และ E2.....	93
51	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ F	97
52	ข้อมูล ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ F	98
53	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร F	99
54	ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ F	100
55	ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ F	101
56	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ I	105
57	ข้อมูล ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ I	105
58	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร I	107
59	ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ I	108
60	ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ I	108
61	ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ K	111
62	ข้อมูล ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ K	111
63	ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร K	112

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
64 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ K	112
65 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ K	113
66 แสดงค่า ED ₅₀ และปริมาณร้อยละของสารที่แยกได้	118
67 แสดงค่า ED ₅₀ และปริมาณร้อยละของสารผสมในสารสกัด hexane และ CH ₂ Cl ₂	119

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด CH_2Cl_2 ของข่อย <i>Streblus asper</i>	7
2	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากผลราชัด <i>Brucea javanica</i> (Linn.) Merr.	8
3	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด EtOH ผลราชัด <i>Brucea javanica</i> (Linn.) Merr.	9
4	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด MeOH ของ <i>Alstonia macrophylla</i>	11
5	สูตรโครงสร้างของ rhinacanthin-Q	12
6	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด MeOH ของ <i>Mallotus japonicus</i> Muell. Arg.	14
7	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด acetone ของ <i>Mallotus repandus</i> (Willd.) Mueller-Arg.	15
8	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane ของ <i>Mallotus repandus</i> (Willd.) Mueller-Arg.	16
9	สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane ของ <i>Mallotus oblongifolius</i> Muel. Arg.	17
10	แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการสกัดสารและทดสอบความเป็นพิษ จากลำต้นหลอดเดือนโดยสังเขป	23
11	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane	29
12	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H11	30
13	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H13	30
14	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H13.4	31
15	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H14	31
16	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H15	32
17	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด CH_2Cl_2	39
18	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5	39
19	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2	40
20	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2.3	40
21	แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2.4	41

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2.5	41
23 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.3	42
24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2	44
25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ A	47
26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม H13	48
27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม H13.3	50
28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 H13.4.4	53
29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ E	56
30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ F	57
31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ G	60
32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.2.3.1 D5.2.3.2 D5.3.2.3	63
33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.2.4.1-D5.2.4.4	65
34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.2.5.1-D5.2.5.4	67
35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความ เข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.3.1 D5.3.2 D5.3.3	69

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
36	สูตรโครงสร้างสารประกอบ A ; 3-acetylaleuritolic acid	71
37	การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ B1 และ B2	76
38	สูตรโครงสร้างสารประกอบ B1 และ B2 ; stigmastan-3,6-dione และ stigmast-22-en-3,6-dione	77
39	การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ C	81
40	สูตรโครงสร้างสารประกอบ C ; 3 β -acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide	82
41	การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ D1 และ D2	88
42	สูตรโครงสร้างสารประกอบ D1 และ D2 ; stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ stigmast-4,22-dien-6 β -ol-3-one	89
43	การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ E1 และ E2	95
44	สูตรโครงสร้างสารประกอบ E1 และ E2 ; 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one และ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol	96
45	แสดงความสัมพันธ์ของคาร์บอนกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล ของสารประกอบ F	101
46	สูตรโครงสร้างสารประกอบ F ; 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa- tricyclo[12.2.1.0 ^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione	102
47	สูตรโครงสร้างสารประกอบ G ; stigmasterol	103
48	แสดงความสัมพันธ์ของคาร์บอนกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล ของสารประกอบ I	109
49	สูตรโครงสร้างสารประกอบ I ; aurantiamide acetate	109
50	แสดงความสัมพันธ์ของคาร์บอนกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล ของสารประกอบ K	113
51	การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ K	114
52	สูตรโครงสร้างสารประกอบ K ; scopoletin	114
53	FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ A	130
54	¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) ของสารประกอบ A	131

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
55 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ B	132
56 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ B	133
57 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ B	134
58 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B	135
59 Mass spectrum ของสารประกอบ B	136
60 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ C	137
61 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ C	138
62 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ C	139
63 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ C	140
64 HMQC spectrum ของสารประกอบ C	141
65 Mass spectrum ของสารประกอบ C	142
66 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ D	143
67 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ D	144
68 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ D	145
69 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ D	146
70 HMQC spectrum ของสารประกอบ D	147
71 Mass spectrum ของสารประกอบ D	148
72 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ E	149
73 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ E	150
74 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ E	151
75 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ E	152
76 Mass spectrum ของสารประกอบ E	153
77 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ F	154
78 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ F	155
79 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ F	156
80 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ F	157

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
81 ^{13}C DEP-T90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ F	158
82 HMQC spectrum ของสารประกอบ F	159
83 HMBC spectrum ของสารประกอบ F	160
84 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ G	161
85 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ G	162
86 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ H	163
87 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ I	164
88 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ I	165
89 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ I	166
90 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ I	167
91 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ I	168
92 HMQC spectrum ของสารประกอบ I	169
93 HMBC spectrum ของสารประกอบ I	170
94 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ J	171
95 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ K	172
96 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ K	173
97 ^1H NMR D_2O exchange spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ	174
98 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ K	175
99 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ K	176
100 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ K	177
101 HMQC spectrum ของสารประกอบ K	178
102 HMBC spectrum ของสารประกอบ K	179
103 Mass spectrum ของสารประกอบ K	180
104 ลักษณะของเซลล์มะเร็งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	182

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขและมีความรุนแรงของโรคมามากขึ้น รายงานของกองสถิติกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2543 ปรากฏว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายสูงสุดเป็นอันดับหนึ่ง (กระทรวงสาธารณสุข. 2543) โรคมะเร็งมีโอกาสดำเนินชีวิตกับคนทุกเพศทุกวัย พบว่าช่วงอายุที่เป็นมะเร็งกันมากที่สุดในประเทศชายอยู่ในช่วงอายุ 75 ปี ในเพศหญิงอยู่ในช่วงอายุ 70 ปี มะเร็งสามารถเกิดขึ้นกับอวัยวะทุกส่วนของร่างกาย ในเพศชายพบมะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ รองลงมาตามลำดับ และ 3 ลำดับแรกสูงสุดที่พบในเพศหญิงคือ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม และมะเร็งตับ ส่วนในเด็กพบว่าเป็นมะเร็งระบบเลือดและมะเร็งสมองมากที่สุด (Ministry of Public Health. 2003 : 12-13) โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีความรุนแรงก่อให้เกิดการเจ็บป่วยและการตายสูง ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ด้วยเหตุนี้ในวงการแพทย์และวิทยาศาสตร์จึงมีการศึกษาวิจัยสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง การบำบัดรักษาโรคมะเร็ง และการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งทั้งชนิดที่สังเคราะห์และจากธรรมชาติกันอย่างกว้างขวาง

สมิตรา ทองประเสริฐ (2536 : 105-121) กล่าวถึงการนำสารเคมีมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันว่า ยาเคมีบำบัดแต่ละชนิดมีสมบัติเฉพาะตัว สมบัติของยาเคมีบำบัดโดยทั่วไปต้องมีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งได้มากกว่าเซลล์ปกติ ยาเคมีบำบัดมีปัจจัยในการออกฤทธิ์แตกต่างกัน การใช้ยาเคมีบำบัดอาจจะใช้ยาอย่างเดี่ยวหรือใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน ยาเคมีบำบัดมีบทบาทเป็นยารักษามะเร็งในระยะแพร่กระจายและ/หรือเป็นยารักษาเสริม (adjuvant therapy) ในกรณีที่ต้องการควบคุมและทำลายเซลล์มะเร็งที่หลงเหลืออยู่ หรือใช้เป็นยาลดขนาดของก้อนมะเร็งลงก่อนที่จะรักษาด้วยวิธีอื่นให้ได้ผลดียิ่งขึ้น

ยาบางชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งกันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ได้มาจากการสกัดจากพืชชั้นสูง เช่น vinblastine และ vincristine เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง *Catharanthus roseus* G. Don (Chabner & Myers. 1993 : 382) Taxal จากต้น Pacific yew *Taxus brevifolia* (Wall, Wani & Taylor. 1976 : 1023) พืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมะเร็งส่วนใหญ่ใช้จากประสบการณ์หรือคำบอกเล่าสืบต่อกันมา (empirical) หรือเป็นยาพื้นบ้าน (folklore medicine) ที่มีบันทึกไว้ในตำรายาแพทย์แผนโบราณ เช่น กระดาด *Alocasia indica* Schott. วงศ์ Araceae ข่อย *Streblus asper* Lour. วงศ์ Moraceae ข้าวเย็น *Smilax* spp. วงศ์ Smilacaceae คางคกเดี๋ย *Arfeuillea arborescens* Pierre. วงศ์ Sapindaceae ทองพันชั่ง

Rhinacanthus communis Nees. วงศ์ Acanthaceae (กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน. 2530 : 3-6)

นักวิทยาศาสตร์หลายคนได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร เช่น แอนเดอสัน และคณะ (Anderson, *et al.* 1991 : 62-64) ศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบกลุ่ม quassinoid ที่สกัดและแยกได้จากส่วนของผลราชดัด *Brucea javanica* (Linn.) Merr. พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.008 - 0.55 $\mu\text{g/mL}$ ฟูกามิยะ และคณะ (Fukamiya, *et al.* 1992 : 468-475) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารประกอบ bruceoide C ที่แยกจากสารสกัดของผลราชดัด ต่อเซลล์มะเร็งชนิด A-549 HCT-8 TE-671 และ P-388 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.44 $\mu\text{g/mL}$ 4.51 $\mu\text{g/mL}$ 0.29 $\mu\text{g/mL}$ และ 5.11 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ส่วนในเซลล์มะเร็งชนิด KB และ RPMI มีค่า ED_{50} น้อยกว่า 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ต่อมา โอนิชิ และคณะ (Ohnishi, *et al.* 1995 : 1032-1038) แยกสารสกัดจากผลราชดัดพบสารประกอบกลุ่ม quassinoid glucoside อีกสามชนิดและศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองจำนวน 9 ชนิด โดยมีค่า Log GI_{50} เท่ากับ -4.14 ถึง -5.72

นิวตัน แก้วประดับ และคณะ (Keawpradub, *et al.* 1997 : 97-101) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด MeOH จากเปลือกรากของพืชสกุล *Alstonia* จำนวน 3 ชนิด คือ ทุ้งฟ้า *Alstonia macrophylla* *Alstonia glaucescens* และพญาสัตบรรณ *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. ต่อเซลล์มะเร็งชนิด MOR-P และ COR-L23 พบว่าสารสกัดจากเปลือกรากของทุ้งฟ้า มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด จึงนำสารสกัด MeOH ละลายใน 10% AcOH ทำให้เป็นเบสด้วย Na_2CO_3 และสกัดด้วย CHCl_3 ระเหยตัวทำละลายได้สารสกัด CHCl_3 เมื่อแยกสารสกัด CHCl_3 พบสารอัลคาลอยด์จำนวน 5 ชนิด มีเพียง villalstonine และ O-methylmacralstonine มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด MOR-P มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.3 μM และ 19.6 μM และเซลล์มะเร็งชนิด COR-L23 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.9 μM และ 15.5 μM ตามลำดับ

วู และคณะ (Wu, *et al.* 1998 : 2001-2003) แยกสาร rhinacanthin-Q ได้จากส่วนรากของทองพันชั่ง *Rhinacanthus nasutus* ในสารสกัด MeOH และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED_{50} มากกว่า 50 $\mu\text{g/mL}$ และเซลล์มะเร็งชนิด P-388 A-543 HT-29 และ HL-60 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.61 $\mu\text{g/mL}$ 3.61 $\mu\text{g/mL}$ 7.60 $\mu\text{g/mL}$ และ 8.90 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

ไฟบิก และคณะ (Fiebig, *et al.* 1985 : 981-985) ศึกษาสารประกอบ strebloside และ mansonin ซึ่งแยกได้จากเปลือกต้นข่อย *Streblus asper* ในสารสกัด CH_2Cl_2 มีความเป็น

พิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED_{50} เท่ากับ $0.035 \mu\text{g/mL}$ และ $0.042 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

บาบู ไชเลสซ์ และปาติคคาลา (Babu, Shylesh & Padikkala. 2002 : 27-32) สกัดใบเหงือกปลาหมอ *Acanthus ilicifolius* โดยใช้ชุดสกัด Soxhlet สกัดด้วย 70% EtOH นำสารสกัด EtOH ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด L-929 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $18 \mu\text{g/mL}$ และพบว่าจากการให้หนูทดลองกินสารสกัด EtOH ปริมาณ 250 mg/kg ของน้ำหนักหนู และ 500 mg/kg ของน้ำหนักหนู พร้อมกับการปลูกถ่ายเนื้องอก สามารถต้านการเจริญเติบโตของเนื้องอกในหนูทดลองได้ดีกว่าการให้สารสกัด EtOH ในหนูทดลองที่ปลูกถ่ายเนื้องอกมาแล้ว 10 วัน และสามารถเพิ่มระยะเวลาการอยู่รอดของหนูทดลองได้

บาบู คูททาน และปาติคคาลา (Babu, Kuttan & Padikkala. 1995 : 53-57) ศึกษาความเป็นพิษสารสกัด EtOH จากใบบัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban. พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด DLA และ EAC 100% ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/mL}$ เมื่อแยกสารสกัด EtOH ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วนำแต่ละส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าส่วนที่ชะด้วยอะซีโตน มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด DLA EAC และ L-929 ในหลอดทดลองมีค่า ED_{50} เท่ากับ $22.0 \mu\text{g/mL}$ $17.0 \mu\text{g/mL}$ และ $8.0 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ จากการให้หนูทดลอง ที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งชนิด DLA กินสารกลุ่มนี้ในปริมาณ 0.04 mg/g ของน้ำหนักหนู ทุก ๆ 5 วัน ปรากฏว่า ขนาดของเนื้องอกเจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มควบคุมและสามารถเพิ่มระยะเวลาการอยู่รอดของหนูทดลองได้

พืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในตำรับยาพื้นบ้านอีกหลายชนิดที่ไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษ นอกจากนี้ยังมีพืชสมุนไพรบางชนิดที่ใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยารักษาโรคมะเร็งจากการบอกเล่าสืบต่อกันมาโดยไม่มีการบันทึกข้อมูลความเป็นพิษ ผลของการรักษา ฯลฯ ไว้เป็นหลักฐาน

หลอดเถื่อน เป็นสมุนไพรที่ใช้ในตำรับยารักษาโรคมะเร็งตำรับหนึ่งที่ได้จากการบอกเล่าสืบต่อกันมา ข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี พิษวิทยายังมีน้อยมาก เป็นพืชสกุล *Mallotus* มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mallotus oblongifolius* Muell. Arg. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น ข้าหลอด เดื่อขี้ฮั่น หรือผักหวานช้างโขลง (ลิ้นา ผู้พัฒนาพงศ์. 2544 : 342) หลอดเถื่อนเป็นไม้พุ่มไม่ผลัดใบหรือไม้ต้นขนาดเล็กสูงถึง 12 เมตร ใบกว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 8-23 เซนติเมตร เรียงแบบตรงกันข้ามและแบบสลับ ขอบใบเป็นซี่หยักตื้น ๆ หรือเกือบจะเรียบ ใบแก่บางเรียบเกลี้ยงหรือมีขนห่าง ๆ บนเส้นกลางใบด้านล่าง เส้นใบที่ฐาน 3-5 เส้น มีต่อม เส้นใบข้าง 8-14 คู่ ก้านใบ 2-6 เซนติเมตร ดอกตัวผู้ช่อยาวไม่แตกแขนง ยาวถึง 18 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง

3-4 กลีบ เกสรตัวผู้ประมาณ 30 อัน ดอกตัวเมียเป็นช่อเรียวยาว ยาวถึง 20 เซนติเมตร ช่อกลิบลี้นี้รูปคนโทเป็น 2 พู หรือแยกออกด้านหนึ่ง ก้านเกสรตัวเมีย 5-7 มิลลิเมตร ปลายคล้ายขนนก ขนาดผล 1-1.3 เซนติเมตร มีตุ่มสีน้ำตาลแดงหรือหนามเล็ก ๆ (ไซมอน การ์ดเนอร์. 2000 : 315) หลอดเดือนเป็นพืชที่เพิ่มเข้าไปในตำรายาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งของแพทย์แผนโบราณตำรับหนึ่งพร้อมกับเหงือกปลาหมอ *Acanthus ilicifolius* สมุนไพรตำรับนี้เดิมประกอบด้วย ไฟเดียนห้า *Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Ewell หญ้าปักไก่ดำ *Polygala chinensis* Linn. พุทธรักษา *Canna indica* Linn. ข้าวเย็นเหนือ *Smilax carbularia* Kunth C และลิ้นงูเห่า *Clinacanthus siamensis* Brem พรศิริประเสริฐ (Pornsiriprasert. 1986) ศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรตำรับเดิมนี้นพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB มีค่า ED_{50} มากกว่า $30 \mu\text{g/mL}$ สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดและยืดอายุของหนูขาวที่เป็นมะเร็งที่ได้น้ำได้ อนันต์ (อนันต์ คงชุม. 2544) พบว่าสารสกัด hexane จากลำต้นหลอดเดือนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด P-388 มีค่า ED_{50} $64 \mu\text{g/mL}$ เมื่อนำสารสกัด hexane มาแยกได้สารบริสุทธิ์ คือ 3-acetylauritolic acid และสารผลสมอีก 2 กลุ่ม คือ β -sitosterol กับ stigmasterol และ stigmasterol-4-en-3-one กับ stigmasterol-4,22-dien-3-one นอกจากนี้ยังพบกลุ่มของสารประกอบที่มีสภาพความเป็นขั้วสูงกว่าสารที่แยกออกมาได้ปริมาณน้อยมากและมีความสลับซับซ้อนแต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด P-388 ค่อนข้างสูงพบว่า มีค่า ED_{50} $17 \mu\text{g/mL}$ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี ในส่วนที่มีความเป็นพิษทั้งในสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสารที่มีอยู่ในลำต้นหลอดเดือนให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาต้านมะเร็งต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารบางชนิดที่มีอยู่ในส่วนที่เป็นพิษของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 จากลำต้นหลอดเดือน
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด P-388 ของสารเคมีบางชนิดที่มีอยู่ในส่วนที่เป็นพิษของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 จากลำต้นหลอดเดือน

ความสำคัญของการวิจัย

ผลของการวิจัยครั้งนี้สามารถจะให้ข้อมูลพื้นฐานต่อไปนี้

1. สูตรโครงสร้างของสารบางชนิดที่อยู่ในส่วนที่เป็นพิษของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 จากลำต้นหลอดเถื่อนจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสังเคราะห์สารประกอบและ/หรืออนุพันธ์ของสารประกอบประเภทเดียวกันหรือใกล้เคียงกันซึ่งอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงขึ้น
2. ทราบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบบางชนิดที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเนื้องอกและต้านมะเร็ง และนำไปสู่การพัฒนาต่อด้านมะเร็งในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ส่วนของหลอดเถื่อนที่นำมาศึกษาคือ เปลือกและเนื้อไม้ลำต้นหลอดเถื่อน ที่แห้ง
2. ศึกษาเฉพาะสารที่แยกได้จากส่วนที่เป็นพิษของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 จากลำต้นหลอดเถื่อน
3. การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์จะทำเฉพาะสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 และ/หรือสารที่เป็นของแข็งผสมอยู่เท่านั้น โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี และการตกผลึก
4. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ใช้วิธีการทางสเปกโตรสโคปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Infrared Spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry)
5. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ จะทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิด P-388 ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*)
6. การหาค่า ED_{50} จะศึกษาเฉพาะสารบริสุทธิ์หรือส่วนของสารผสมที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 เท่านั้น

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. P-388 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cell) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (suspension cell)
2. สารส่วนที่เป็นพิษ หมายถึงกลุ่มของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด P-388 มีค่า $\text{ED}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอในหัวข้อตามลำดับดังนี้

1. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรต้านมะเร็ง
2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดในพืชสกุล *Mallotus*

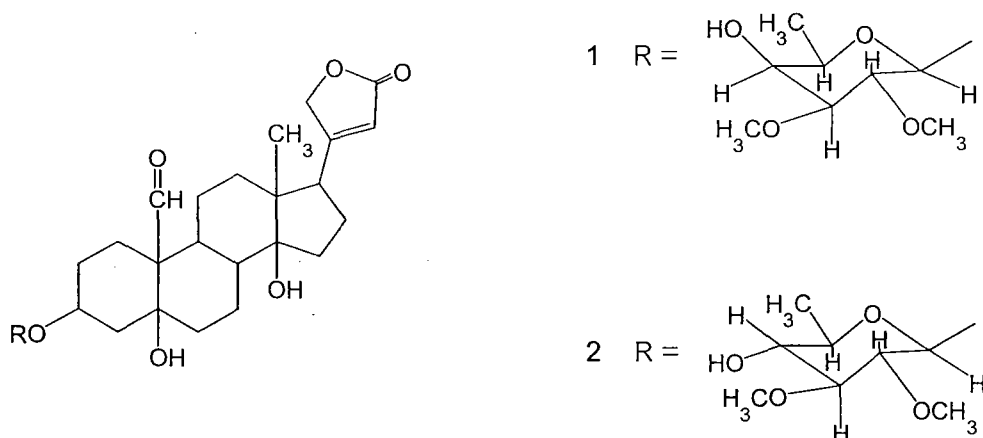
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรต้านมะเร็ง

พรณิภา ชุมศรี (2536 : 346-363) กล่าวว่า การค้นคว้าหาตัวยาสำคัญจากพืชชั้นสูงที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมีความยุ่งยากและมีตัวแปรหลายประการ การค้นคว้าวิจัยต้องมีผลงานที่ทำแล้วให้ผลเหมือนเดิมเสมอ (reproducible nature) สารสกัดหายากจากพืชมักให้ผลการทดลองที่มีความเชื่อถือไม่เพียงพอเมื่อเทียบกับตัวยารับรู้ฤทธิ์ เนื่องจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสามารถนำมาใช้เพื่อการบำบัดโรคนั้นส่วนใหญ่ได้มาจากผลการลองผิดลองถูก (trial and error) ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือและเพื่อให้เกิดการพัฒนาตัวยาใหม่จะต้องผ่านขั้นตอนของการสกัด การแยกสารสำคัญ การพิสูจน์หาสูตรโครงสร้าง เพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์หรือดัดแปลงสูตรโครงสร้างของสารเพื่อให้ผลการบำบัดรักษาที่ดีขึ้น

เอมอร โสมนะพันธุ์ (2536 : 202-240) ได้กล่าวถึงการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งและแนวทางในการศึกษาด้านพิษเคมีของสมุนไพร วิธีการหาสารต้านมะเร็งจากสารสกัดจากธรรมชาติว่า ปัจจุบัน NCI ของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institute, USA.) ใช้วิธีการสำรวจสารสกัดจากพืช โดยการทดสอบเบื้องต้นในหลอดทดลอง และการทดลองในสัตว์ทดลองซึ่งทำให้เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P-388 หลังจากที่สามารถยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดหายากแล้วจึงทำการแยกสาร ออกฤทธิ์ด้วยวิธี bioassay directed fractionation จากการศึกษาของ NCI พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในพืชมักพบปริมาณน้อยมาก (1-100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กิโลกรัม) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในแต่ละส่วนที่แยกได้ควบคู่ไปด้วย ซึ่งวิธีทดลองที่ใช้นิยมทำในหลอดทดลอง เนื่องจากมีราคาถูก ใช้สารตัวอย่างน้อย มีความไวสูง และรวดเร็ว เซลล์มะเร็งที่นิยมใช้ทดสอบได้แก่ มะเร็งชนิด KB และ P-388 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จะถือว่าเป็นฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งเมื่อมีค่า $ED_{50} < 4 \mu g/mL$ การสกัดสารให้ได้สารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์จะใช้ตัวทำละลายสกัดให้ได้สารสกัดก่อนแล้วจึงแยกสารสกัดออกเป็นส่วนด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟี

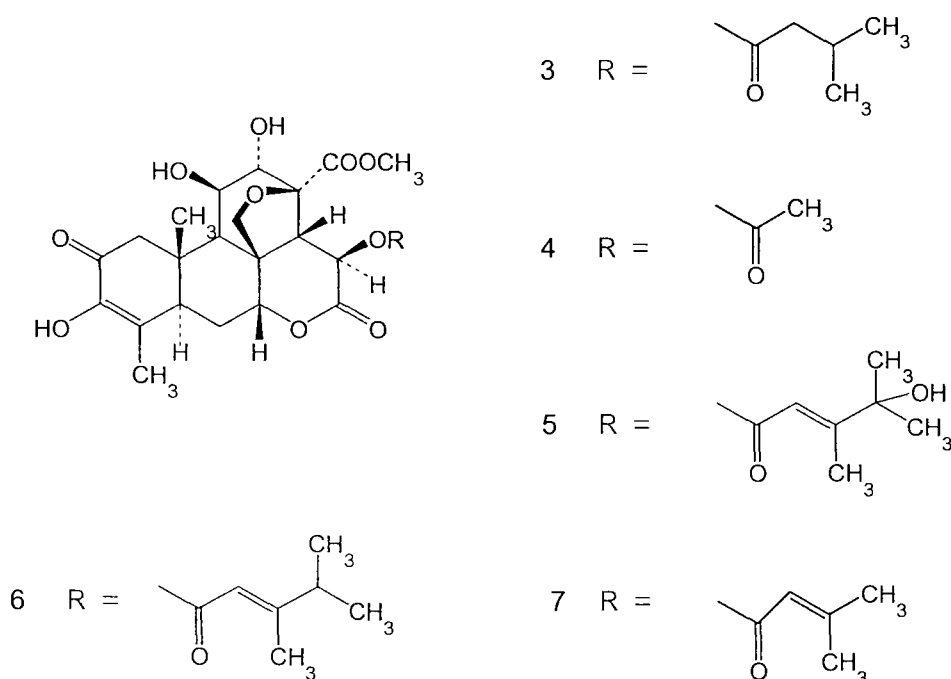
จนได้สารบริสุทธิ์ การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์จะใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี สารที่น่าสนใจจะนำไปทดสอบในหนูทดลองที่ทำให้เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว P-388 เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ จากนั้นก็จะนำไปทดสอบกับสัตว์ทดลองที่ทำให้เป็นมะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม ฯลฯ หากสารดังกล่าวให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ก็จะพิจารณาความเหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป โดยพิจารณาจากความแปลกใหม่ของโครงสร้างทางเคมีของสาร ผลของการต้านหรือทำลายเซลล์มะเร็ง ตลอดจนจนถึงความเป็นไปได้ของการผลิตสารในปริมาณมาก จากนั้นจึงนำไปศึกษาด้านพิษวิทยาอย่างละเอียด และขั้นคลินิกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งในคน หากผลการศึกษาในขั้นคลินิกให้ผลน่าพอใจ ก็จะนำสารชนิดนั้นมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง

ไฟบิก และคณะ (Fiebig, et al. 1985 : 981-985) แยกสารสกัด CH_2Cl_2 ของเปลือกต้นข่อย *Streblus asper* ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ะด้วยระบบ gradient โดยใช้ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ส่วนละประมาณ 30 mL พบว่าส่วนที่ 31-36 ซึ่งชะด้วยสารละลาย $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 19:1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.049-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ส่วนที่ 33 และ 34 มีความเป็นพิษมากที่สุด เมื่อนำมาตกผลึกในสารละลาย hexane: $\text{Et}_2\text{O}:\text{PrOH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 7:16:6:10:8 ได้ผลึกผสมของ cardiac glycoside เมื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ในตัวทำละลายเดียวกัน ได้สารประกอบ strebloside (1) มีค่า R_f 0.60 และสารประกอบ mansonin (2) มีค่า R_f 0.74 สูตรโครงสร้างสารดังกล่าวภาพประกอบ 1 ค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ของสารประกอบทั้งสองเท่ากับ 0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 0.042 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ



ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด CH_2Cl_2 ของข่อย *Streblus asper*

แอนเดอสัน และคณะ (Anderson, *et al.* 1991 : 62-64) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลองของสารกลุ่ม quassinoid สูตรโครงสร้างสารดังภาพประกอบ 2 ได้แก่ สารประกอบ bruceine A (3) bruceine B (4) bruceine C (5) bruceantin (6) และ brusatol (7) ซึ่งแยกได้จากส่วนของผลราชัด *Brucea javanica* (Linn.) Merr. พบว่ามีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.098 $\mu\text{g/mL}$ 0.55 $\mu\text{g/mL}$ 0.021 $\mu\text{g/mL}$ 0.008 $\mu\text{g/mL}$ และ 0.102 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

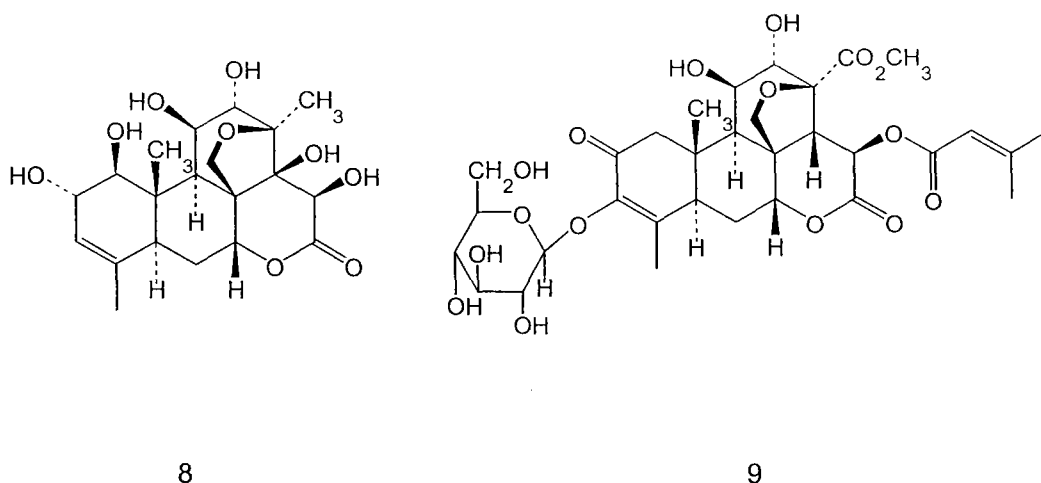


ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากผลราชัด *Brucea javanica* (Linn.) Merr.

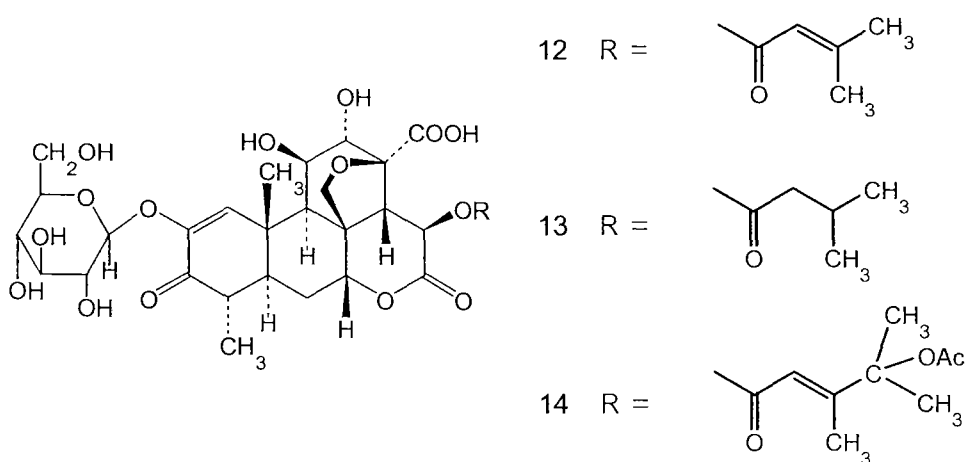
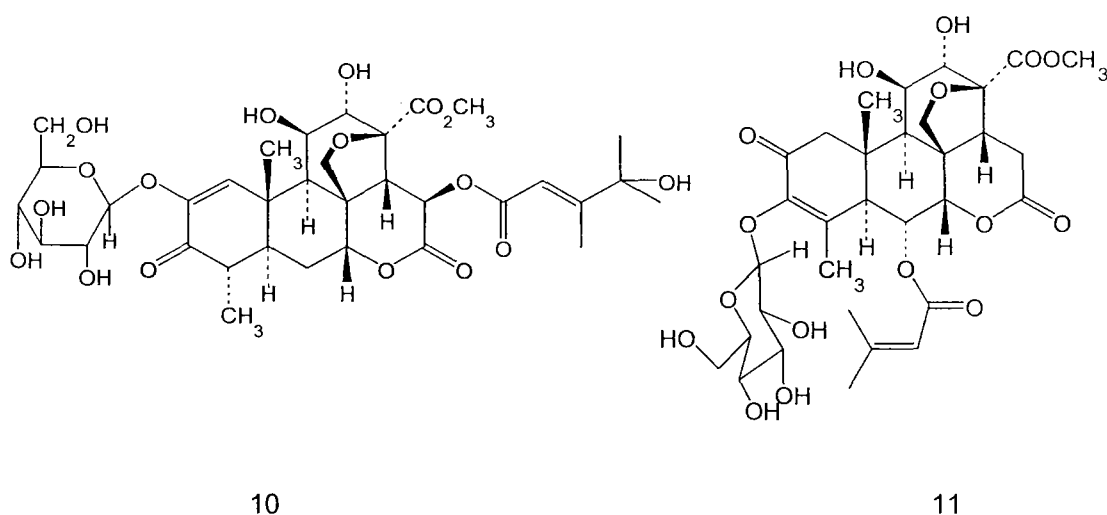
ฟูคามิยะ และคณะ (Fukamiya, *et al.* 1992 : 468-475) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งของสารสกัด EtOH ของผลราชัด ด้วยวิธีการแบ่งส่วนการละลายระหว่าง H_2O กับ hexane แยกชั้น hexane ออก นำชั้น H_2O มาสกัดแยกด้วยวิธีแบ่งส่วนการละลายด้วย CHCl_3 และ $n\text{-BuOH}$ ตามลำดับ นำสารสกัด $n\text{-BuOH}$ แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ะด้วยสารละลาย $\text{EtOAc}:\text{Et}_2\text{O}$ (1:1) เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ได้ 4 ส่วน ะต่อด้วยสารละลาย $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (50:14:3) เก็บได้อีก 11 ส่วน และะด้วย MeOH ได้อีก 1 ส่วน พบว่าส่วนของ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ มีสารประกอบกลุ่ม quassinoid glycoside นำมาแยกต่อด้วยเทคนิค HPLC (DYNAMAX-60A, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1) ได้สารประกอบที่ไม่บริสุทธิ์ 4 ชนิด คือ brucein E (8) bruceoside B (9) yadanzioside C (10) และ bruceoside C (11)

สารประกอบ 8 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ส่วนสารประกอบ 9 10 และ 11 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC (DYNAMAX-60A, MeOH:H₂O 2:3) ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของสารประกอบ 11 มีค่า ED₅₀ ดังนี้ A-549 เท่ากับ 0.44 µg/mL HCT-8 เท่ากับ 4.51 µg/mL TE-671 เท่ากับ 0.29 µg/mL และ P-388 เท่ากับ 5.11 µg/mL ความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งชนิด KB และ RPMI ค่า ED₅₀ น้อยกว่า 0.1 µg/mL

โอนิชิ และคณะ (Ohnishi, *et al.* 1995 : 1032-1038) แยกสารสกัด EtOH ของผลราชดัดวิธีเดียวกันกับฟูกามิยะ ดังกล่าวข้างต้น แล้วแยกส่วนที่ชะด้วย MeOH ต่อด้วยเทคนิค HPLC (Sephadex LH-20) ใช้ H₂O:MeOH:AcOH อัตราส่วน 70:30:1 60:40:1 และ 55:45:1 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้สารประกอบ bruceoside D (12) bruceoside E (13) และ bruceoside F (14) ตามลำดับ ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งสมอง มะเร็งเม็ดสี มะเร็งรังไข่ มะเร็งไต มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม มีค่า Log GI₅₀ เท่ากับ -4.14 ถึง -5.72 สารประกอบที่แยกจากสารสกัด EtOH ของผลราชดัด สูตรโครงสร้างสารดังกล่าวประกอบ 3



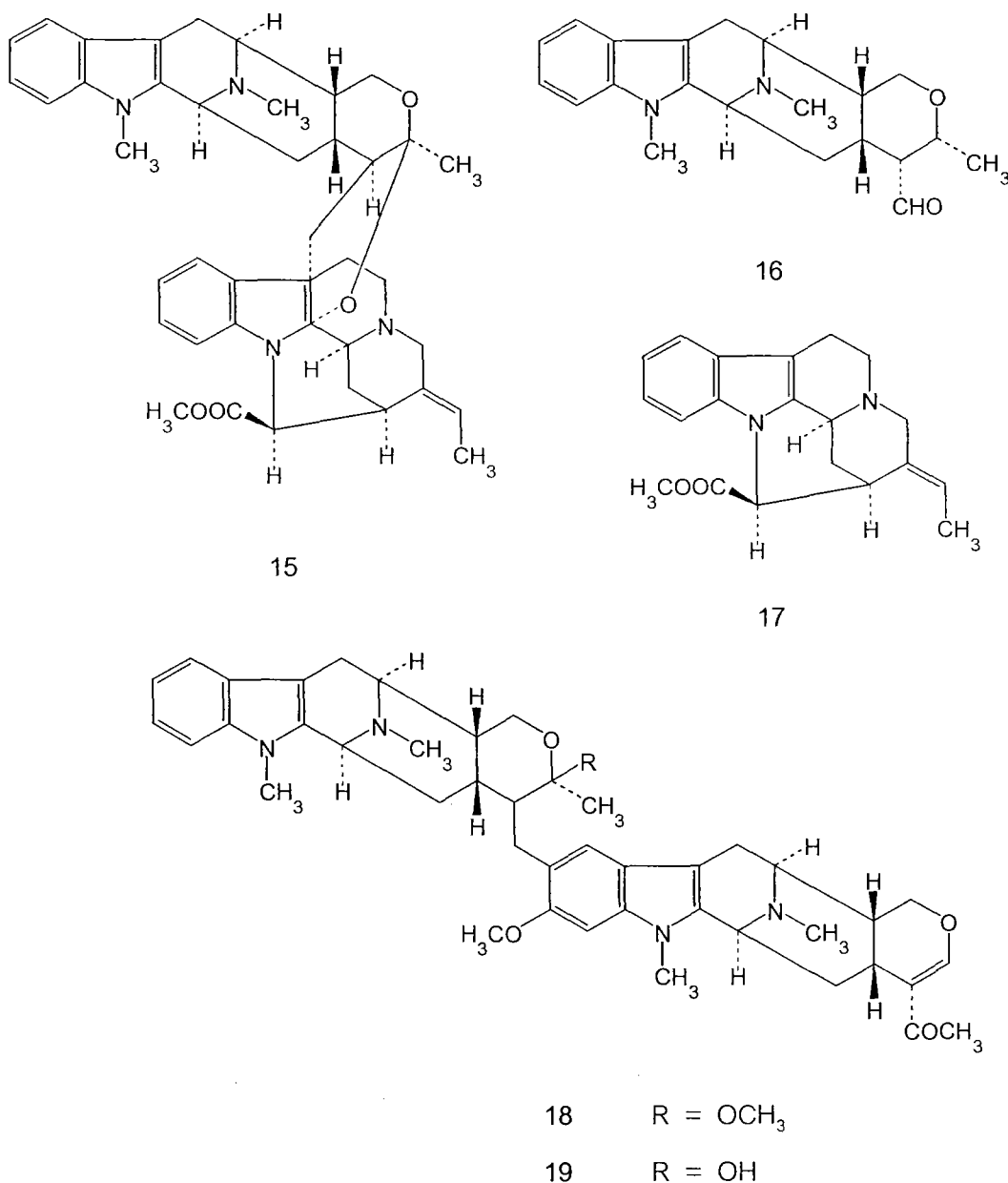
ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด EtOH ผลราชดัด *Brucea javanica* (Linn.) Merr.



ภาพประกอบ 3(ต่อ) สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด EtOH ผลราชัด *Brucea javanica* (Linn.) Merr.

นิวัฒน์ แก้วประดับ และคณะ (Keawpradub, et al. 1997 : 97-101) ศึกษาสารสกัด MeOH จากเปลือกรากทั้งฟ้า *Alstonia macrophylla* โดยการนำสารสกัด MeOH ละลายใน AcOH 10% ทำให้เป็นเบสด้วย Na_2CO_3 และสกัดด้วย CHCl_3 นำสารสกัดชั้น CHCl_3 ระเหยตัวทำละลายได้สารสกัด CHCl_3 และแยกสารสกัด CHCl_3 ด้วยเทคนิค TLC ใช้สารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 7:3 สามารถแยกสารออกได้จำนวนสี่กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แยกกลุ่มที่มีความเป็นพิษสูงด้วยเทคนิค TLC โดยชะด้วยสารละลาย NH_3 อิมิดใน CHCl_3 ได้สารประกอบ villalstonine (15) และ talcarpine (16) นำสารผสมที่เหลือแยกด้วยเทคนิค TLC ชะด้วยสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 7:2 ได้สารประกอบ

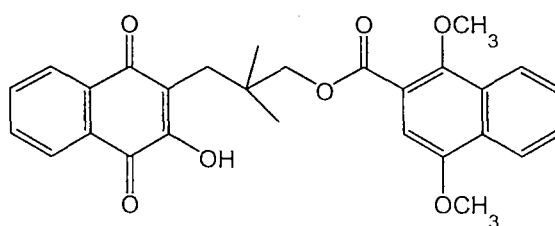
pleiocarpamine (17) และสารผสมที่เมื่อแยกด้วยสารละลาย $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ อัตราส่วน 9:1 ได้สารประกอบ macralstonine (18) และ O-methylmacralstonine (19) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด MOR-P ในวันที่ 6 ของสารประกอบ 15 และ 19 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $2.3 \mu\text{M}$ และ $19.6 \mu\text{M}$ และเซลล์มะเร็งชนิด COR-L23 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $2.9 \mu\text{M}$ และ $15.5 \mu\text{M}$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างสารดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด MeOH ของทั้งฟ้า

Alstonia macrophylla

วู และคณะ (Wu, et al. 1998 : 2001-2003) แยกสาร rhinacanthin-Q (20) ได้จาก สารสกัด MeOH ของรากทองพันชั่ง *Rhinacanthus nasutus* โดยการแบ่งส่วนการละลายระหว่าง $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ ในสารสกัดชั้น CHCl_3 แยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย hexane และเพิ่มหัวด้วย EtOAc ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบ 20 ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลอง มีค่า $\text{ED}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ แต่ให้พิษต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด P-388 A-543 HT-29 และ HL-60 มากกว่าโดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ $0.61 \mu\text{g/mL}$ $3.61 \mu\text{g/mL}$ $7.60 \mu\text{g/mL}$ และ $8.90 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างสารดังภาพประกอบ 5



20

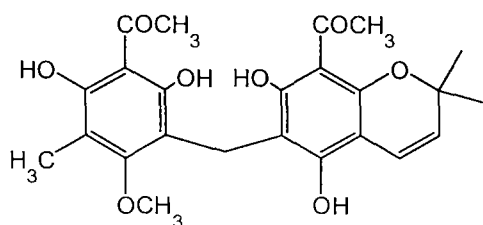
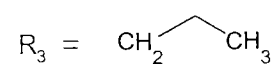
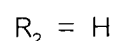
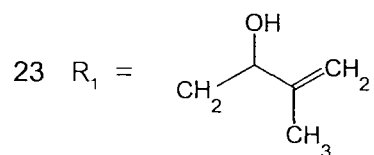
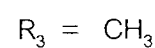
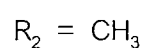
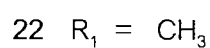
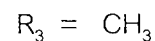
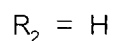
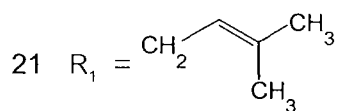
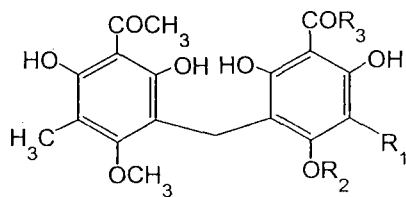
ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของ rhinacanthin-Q

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีฤทธิ์ทางชีวภาพของ สารสกัดในพืชสกุล Mallotus

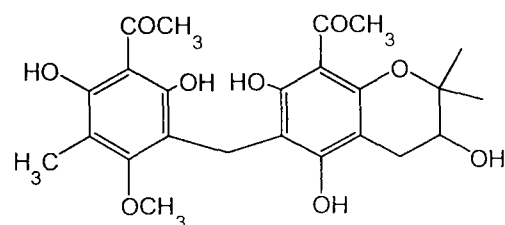
อริซาวา และคณะ (Arisawa, et al. 1985 : 455-459) ได้ศึกษาสารสกัด MeOH จาก เปลือกผลของ *Mallotus japonicus* Muell. Arg. ที่ได้จากการสกัดแบบแบ่งส่วนการละลาย ระหว่าง petroleum ether กับ 90% MeOH โดยนำสารสกัดที่ได้จากชั้น 90% MeOH มาสกัดแบ่ง ส่วนการละลายระหว่าง CHCl_3 กับ 10% MeOH นำสารสกัดที่ได้ในชั้น CHCl_3 แยกต่อด้วยเทคนิค คอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย CHCl_3 และเพิ่มหัวด้วย MeOH ใน สัดส่วน 1% 2% 5% 10% และ 100% ส่วนที่ชะด้วยด้วย CHCl_3 ได้สารประกอบ 3-(3,3-dimethylallyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phloracetophenone (21) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และเซลล์มะเร็งชนิด L-5178Y มีค่า ED_{50} เท่ากับ $0.58 \mu\text{g/mL}$ และ $0.74 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ส่วนที่ชะด้วย MeOH 1% ใน CHCl_3 เมื่อนำแยกด้วย เทคนิคโครมาโทกราฟี ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยสารละลาย EtOAc:hexane พบว่าส่วน

ที่ชะด้วย 5% EtOAc ใน hexane ได้สารประกอบ 8-acetyl-5,7-dihydroxy-6-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-2,2-dimethylchromene (22) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และเซลล์มะเร็งชนิด L-5178Y มีค่า ED_{50} เท่ากับ $2.10 \mu\text{g/mL}$ และ $1.25 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ส่วนที่ชะด้วย 10% EtOAc ใน hexane ได้สารประกอบ 5-methylene-bis-2,6-dihydroxy-3-methyl-4-methoxy acetophenone (23) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ค่า ED_{50} เท่ากับ $2.40 \mu\text{g/mL}$ และเซลล์มะเร็งชนิด L-5178Y ค่า ED_{50} เท่ากับ $6.10 \mu\text{g/mL}$ ต่อมา อริซาวา และคณะ (Arisawa, et al. 1986 : 298-302) แยกสารจากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* Muell. Arg. จากสารสกัด MeOH ด้วยวิธีเดียวกันกับข้างต้น พบว่าในส่วนที่ชะด้วย 15% EtOAc ใน hexane พบ 3-(3-methyl-2-hydroxybut-3-enyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phlorbutyrophenone (24) ค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB เท่ากับ $2.40 \mu\text{g/mL}$ และ ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิด L-5178Y เท่ากับ $6.10 \mu\text{g/mL}$ และ 8-acetyl-5,7-dihydroxy-6-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-2,2-dimethyl-3-hydroxychroman (25) ซึ่งไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด ($ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) สูตรโครงสร้างสารดังกล่าวประกอบ 6

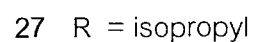
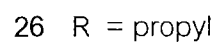
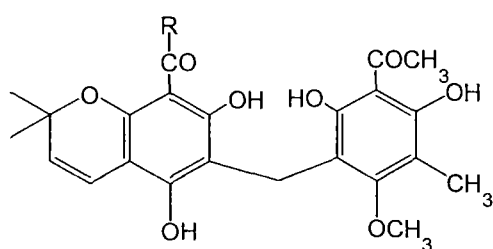
ฟูจิตะ และคณะ (Fujita, et al. 1988 : 708-712) นำสารสกัด MeOH จากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* Muell. Arg. มาสกัดแยกเช่นเดียวกับวิธีการของ อริซาวา และคณะ (Arisawa, et al. 1985 : 455-459) แต่การแยกสารสกัดที่ได้จากชั้น CHCl_3 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีที่ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับนั้นชะด้วยตัวทำละลาย benzene benzene: CHCl_3 (1:1) MeOH: CHCl_3 (1:1) เก็บส่วนที่ชะด้วย benzene นำมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย hexane และเพิ่มซ้ำด้วย EtOAc พบว่าส่วนที่ชะด้วย 2.5% EtOAc ใน hexane เมื่อนำมาแยกด้วยเทคนิค TLC (plate:Kieselgel 60 F254, 0.5 mm; ใช้ hexane:EtOAc (10:1) เป็นตัวชะแยก) ได้ผลึกของผสมของ 5,7-dihydroxy-6-(2',4'-dihydroxy-3'-acetyl-5'-methyl-6'-methoxybenzyl)-8'-butyryl-2,2-dimethylchromene (26) และ 5,7-dihydroxy-6-(2',4'-dihydroxy-3'-acetyl-5'-methyl-6'-methoxybenzyl)-8-isobutyryl-2,2-dimethylchromene (27) แยกสารทั้งสองให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC มีค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB เท่ากับ $3.30 \mu\text{g/mL}$ และ $0.40 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างสารดังกล่าวประกอบ 6



24



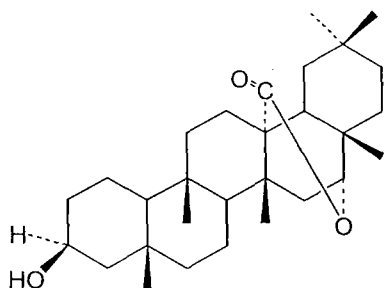
25



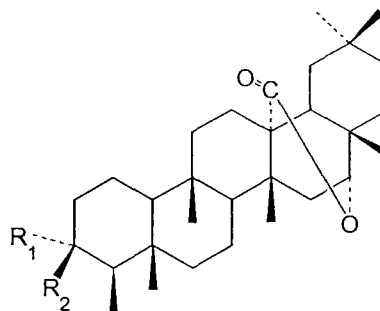
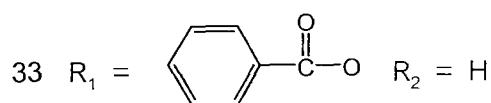
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด MeOH ของ *Mallotus japonicus*

Muell. Arg.

ฮวง และคณะ (Huang, et al. 1999 : 891-892) แยกสารสกัด acetone จากลำต้นและเปลือกรากมะกายเครือ *Mallotus repandus* (Willd.) Mueller-Arg. ด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย cyclohexane:EtOAc (10:1)

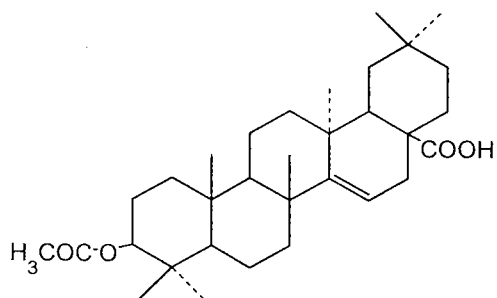


31

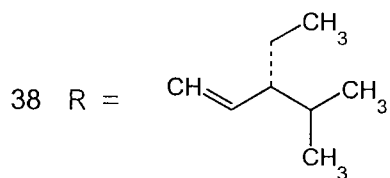
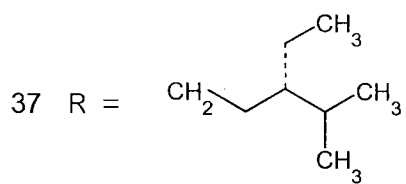
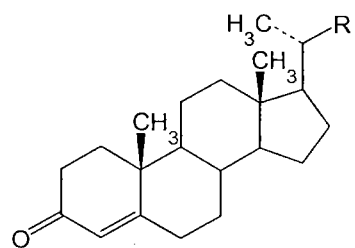
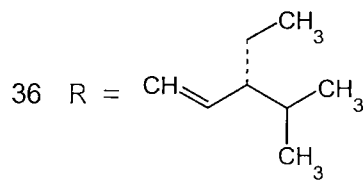
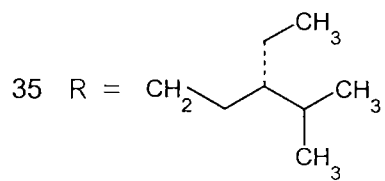
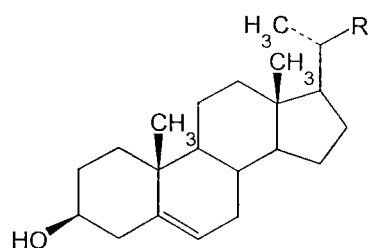
32 $R_1 = R_2 = O$ 33 $R_1 = \text{C}_6\text{H}_5\text{C}(=\text{O})\text{O}$ $R_2 = \text{H}$

ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane ของ *Mallotus repandus* (Willd.) Mueller-Arg.

อนันต์ (อนันต์ คงชุม. 2544) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด hexane ของเปลือกและลำต้นหลอดเถื่อน *Mallotus oblongifolius* Muell. Arg. ต่อเซลล์มะเร็งชนิด P-388 พบว่ามีค่า ED_{50} เท่ากับ $64 \mu\text{g/mL}$ เมื่อนำสารสกัด hexane มาแยกได้สารบริสุทธิ์ คือ 3-acetylaleuritolic acid (34) และสารผสมอีก 2 กลุ่ม คือ β -sitosterol (35) กับ stigmasterol (36) และ stigmasterol-4-en-3-one (37) กับ stigmasterol-4,22-dien-3-one (38) และกลุ่มของสารประกอบที่ไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่มีสภาพขั้วสูงกว่าสารที่แยกได้และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 สูง มีค่า ED_{50} $17 \mu\text{g/mL}$ สูตรโครงสร้างสารดังภาพประกอบ 9



34



ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane ของหลอดเถื่อน *Mallotus oblongifolius* Muell. Arg.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การสกัดสารจากส่วนของลำต้นหลอดเถื่อน
2. การแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัด
3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์
4. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือส่วนของลำต้นหลอดเถื่อน (เปลือกและเนื้อไม้) ได้จากคลินิก นายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี (อนันต์ คงชุม 2544 : 17)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ใช้เซลล์มะเร็ง P-388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู ที่เลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเซลล์ ณ ห้องปฏิบัติการงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ acetone chloroform dichloromethane ethanol ethyl acetate hexane methanol (commercial grade ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นก่อนนำมาใช้งาน)
2. ลำต้นหลอดเถื่อนอบแห้งและบดละเอียด
3. Anisaldehyde (Merck, AR grade)
4. conc. Sulfuric acid (Merck, AR grade)
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, AR grade)
6. Glacial acetic acid (Merck, AR grade)
7. Newborn Calf Serum (NCS) (Biowittaker)
8. Precoated TLC plate (silica gel 60 F₂₅₄ , Merck, 1.05554)

9. RPMI 1640 medium (Gibco laboratories)
 10. Silica gel 60 for column chromatography (0.036-0.200 mm, Merck, 1.07734)
 11. Silica gel 60 GF₂₅₄ for preparative TLC (Merck, 1.07730)
 12. Trypan blue dye (BDH. Chemical)
- หมายเหตุ การเตรียมแสดงในภาคผนวก ค

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Tokyo)
2. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 25 cm² (Aseptic flask) (Costar, UK)
3. เครื่องแก้วสามัญ
4. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Ohaus E04130)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 240)
6. เครื่องบดสมุนไพร
7. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Eletrothermal 9100)
8. ปิเปตขนาดต่าง ๆ
9. อุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้อ
10. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin-Elmer FT-IR Spectrum BX)
11. Haemocytometer (Boceco)
12. Incubator (shellLab. TC2323)
13. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
14. Mass Spectrometer (Finnigan MAT. 90)
15. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AM 300, 300 MHz)
16. Rotary evaporator (Buchi Ratavapor R-114)

การสกัดสารจากส่วนของลำต้นหลอดเถียน

1. การสกัดด้วย hexane

นำส่วนลำต้นหลอดเถียนอบแห้งและบดละเอียดหนัก 60 kg แช่วด้วย hexane (2 kg/5 L) เป็นเวลา 7 วัน กรองเก็บสารละลายที่กรองได้ แยกกากซ้ำด้วย hexane อีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่

ได้จากการกรองระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ได้สารสกัด hexane น้หนัก 73.29 g แบ่งสารสกัดหยาบ hexane 1 g สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนที่เหลือเก็บไว้สำหรับการแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ ดังภาพประกอบ 10

2. การสกัดด้วย CH_2Cl_2

กากที่เหลือจากการสกัดด้วย hexane นำมากระจายและผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แสงสกัดสารเช่นเดียวกันกับ hexane แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น CH_2Cl_2 ได้สารสกัด CH_2Cl_2 น้หนัก 96.53 g แบ่งสารสกัด CH_2Cl_2 1 g สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนที่เหลือเก็บไว้สำหรับการแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ ดังภาพประกอบ 10

การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ

เนื่องจากสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ค่า ED_{50} เท่ากับ 64 $\mu\text{g/mL}$ และ 34 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (ภาพประกอบ 24) จึงนำสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 มาแยกและทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ใช้วิธีบรรจุ silica gel แบบเปียก และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับออกเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ precoated TLC plate (silica gel 60 F_{254} , Merck, 1.05554) และตัวทำละลายที่เหมาะสมมีขั้วใกล้เคียงกับตัวทำละลายที่ใช้แยกในคอลัมน์โครมาโทกราฟี การหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 หรือใช้ anisaldehyde-sulfuric acid พ่นบนแผ่น TLC (Jork et al. 1990 : 195-198) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารแต่ละกลุ่มที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกัน นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

การแยกสารแต่ละกลุ่มให้ได้สารบริสุทธิ์นั้น จะดำเนินการแยกกลุ่มสารที่ให้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ แล้วมีค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ต่ำกว่า 50 เทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นนำส่วนที่แยกได้และมีปริมาณมากพอไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทำเช่นนี้จนได้สารกลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือสารบริสุทธิ์ ส่วนกลุ่มสารที่ให้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ แล้วมีค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งมากกว่า 50 ที่มีปริมาณมากและ/หรือมีของแข็งผสมจะแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ สารบริสุทธิ์ที่ได้ทั้งหมดนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อให้ได้ค่า ED_{50} ของสารบริสุทธิ์ ดังภาพประกอบ 11-23

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง P-388

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบคือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู P-388 เป็นเซลล์ที่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ผิว 25 cm² ใช้ RPMI 1640 ซึ่งมี 10% NCS เป็นอาหาร เลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณ 5% CO₂ ความชื้น 50% และ subculture 2 ครั้ง/สัปดาห์ ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทดสอบที่ความเข้มข้น 30 µg/mL หาค่า ED₅₀ ของกลุ่มสารและสารบริสุทธิ์ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งกับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบในหน่วย µg/mL

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม stock cell suspension

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในในขวดเลี้ยงเซลล์อายุประมาณ 3-4 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion staining) และทำการเจือจางเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 5.0×10^4 cell/mL ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ สารละลายที่ได้เรียกว่า stock cell suspension

การย้อมสีและการนับเซลล์มีวิธีการดังนี้

1. การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ ให้เซลล์กระจายทั่วขวดอย่างสม่ำเสมอ ใช้ปิเปตดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์ 0.20 mL ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.40% trypan blue dye ปริมาตร 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นและลงเบา ๆ จำนวน 5 ครั้ง ปล่อยให้ตั้งไว้ประมาณ 3 – 5 นาที

2. การนับเซลล์

นำเซลล์ที่ย้อมสีหยดลงบน haemocytometer ซึ่งมี cover slide ปิดอยู่ แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue dye) คำนวณจำนวนเซลล์ที่นับได้และเตรียม stock cell suspension โดยการเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.0×10^4 cell/mL การคำนวณจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตรและการหาค่า dilution number เพื่อเตรียม stock cell suspension (ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ง)

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ซึ่งสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบหนัก 4 mg ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติม DMSO 0.10 mL เขย่าให้ละลายให้หมด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 3.90 mL เขย่าให้ละลาย สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ปริมาตร 4 mL และมีความเข้มข้นของ 2.5% DMSO โดยปริมาตร

3. การเตรียมสารละลาย solvent control

ละลาย DMSO 0.25 mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 9.75 mL ได้สารละลาย solvent control 10 mL ที่มีความเข้มข้นของ 2.5% DMSO โดยปริมาตร

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

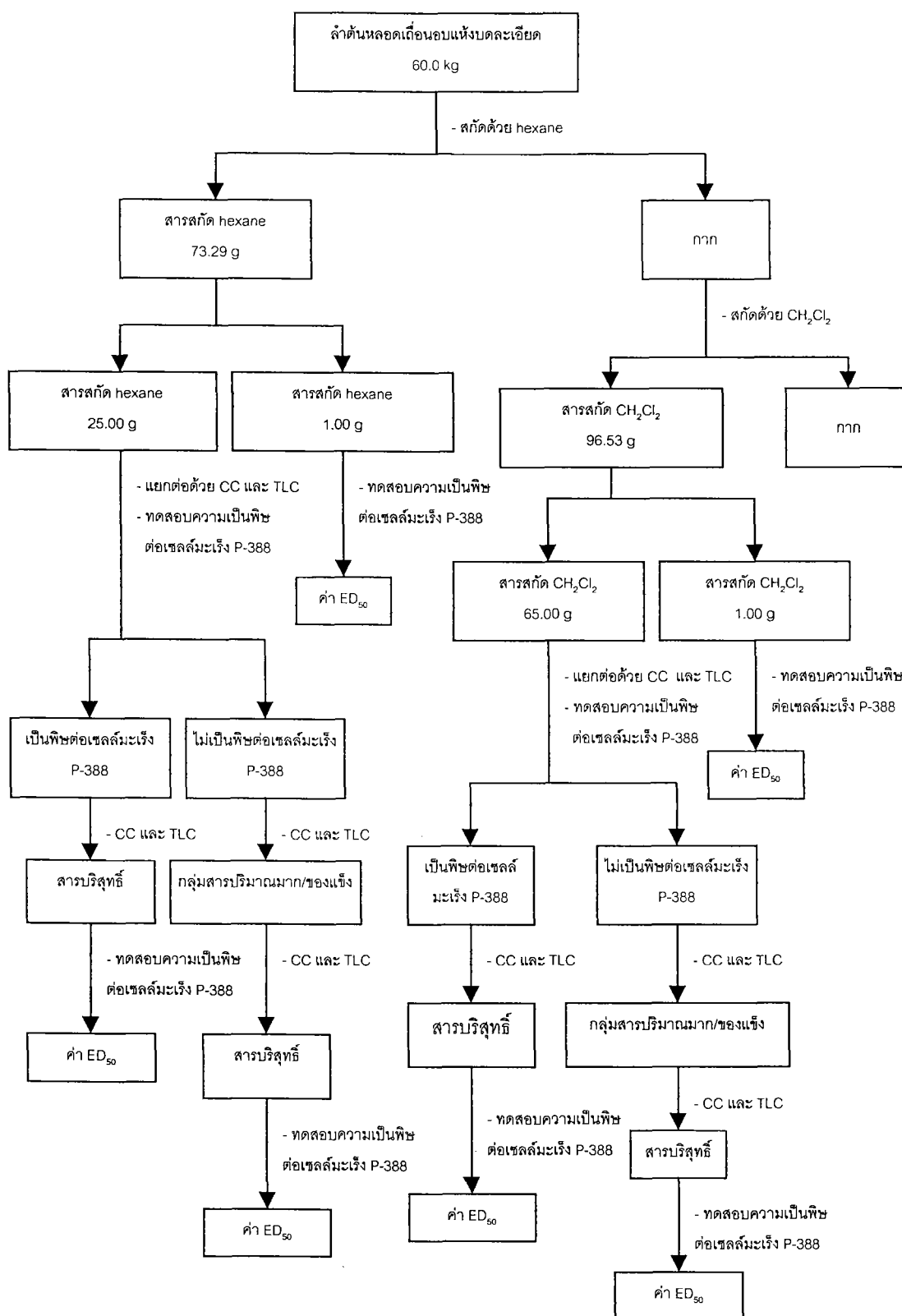
ผสมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่เตรียมได้ในข้อ 2 กับอาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ stock cell suspension ให้ได้สารที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการในขวดเลี้ยงเซลล์ (ตัวอย่างการผสมสารในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแสดงในภาคผนวก ง) และนำไปเลี้ยงในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณ 5% CO₂ เป็นเวลา 4 วัน โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

5. การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็ง P-388

สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 (จากข้อ 4) นับหาค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยถือว่าจำนวนเซลล์มะเร็งของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4 มีร้อยละการอยู่รอดเป็น 100

6. การหาค่า ED₅₀ ของสารที่ทดสอบต่อเซลล์มะเร็ง P-388

การหาค่า ED₅₀ หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) ค่า ED₅₀ คือค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายครึ่งหนึ่งเทียบกับกลุ่มควบคุม (จากกราฟ)



ภาพประกอบ 10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการสกัดสารและทดสอบความเป็นพิษ
จากลำต้นหลอดเถื่อนโดยสังเขป

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการสกัดสารจากลำต้นหลอดเถื่อน

นำลำต้นหลอดเถื่อนอบแห้งและบดละเอียดหนัก 60 kg มาสกัดด้วย hexane และ CH_2Cl_2 ตามลำดับ ได้สารสกัด hexane เป็นสารเหนียวหนืดสีเขียวเข้มหนัก 73.29 g และ สารสกัด CH_2Cl_2 เป็นสารเหนียวหนืดสีดำหนัก 96.53 g (ภาพประกอบ 10)

ผลการแยกสารสกัด hexane และการทำสารให้บริสุทธิ์

1. นำสารสกัด hexane หนัก 25 g มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm บรรจุ silica gel หนัก 875 g เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย hexane: CHCl_3 CHCl_3 CHCl_3 :EtOAc EtOAc และ MeOH ตามสัดส่วนที่ปรากฏในตาราง 1 เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 65 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 15 กลุ่ม (ตาราง 1) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H13 และ H14 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 16) จึงนำสารกลุ่ม H13 และ H14 มาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม H11 และ H15 มีของแข็งผสมจึงนำมาแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 1 ผลการแยกสารสกัด hexane

สารกลุ่ม	ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H1	hexane: CHCl_3 (20:80)	1.85	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
H2	hexane: CHCl_3 (20:80)	0.84	ของเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม
H3	hexane: CHCl_3 (20:80)	0.77	ของเหลวหนืดสีเหลือง
H4	hexane: CHCl_3 (20:80)	0.66	ของเหลวหนืดสีเหลือง
H5	hexane: CHCl_3 (20:80)	0.85	ของเหลวหนืดสีส้ม
H6	hexane: CHCl_3 (10:90)	1.34	ของเหลวหนืดสีส้มเข้ม
H7	CHCl_3 (100%)	1.44	ของเหลวหนืดสีส้มเข้ม
H8	CHCl_3 :EtOAc (90:10)	0.93	ของเหลวหนืดสีส้มเข้ม

ตาราง 1(ต่อ)

สารกลุ่ม	ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H9	CHCl ₃ :EtOAc (90:10)	1.73	ของเหลวหนืดสีส้ม
H10	CHCl ₃ :EtOAc (90:10)	1.35	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
H11**	CHCl ₃ :EtOAc (90:10)	2.70	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้มมีของแข็งสีขาว
H12	CHCl ₃ :EtOAc (80:20)	0.77	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
H13*	CHCl ₃ :EtOAc (50:50)	2.52	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
H14*	EtOAc (100%)	2.50	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
H15**	MeOH (100%)	1.64	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดงมีของแข็งสีขาว

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2. นำสารกลุ่ม H11 น้ำหนัก 2.60 g มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel น้ำหนัก 150 g เป็นตัวดูดซับ ละลายด้วยตัวทำละลาย hexane:EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน hexane ความเข้มข้น (v/v) 5% 10% 20% 40% 80% และใช้ 100% EtOAc เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 2) พบสารกลุ่ม H11.1 และ H11.2 มีของแข็งสีขาวผสมจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 2 ผลการแยกสารกลุ่ม H11

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H11.1**	1.83	ของเหลวหนืดสีเหลืองมีของแข็งสีขาว
H11.2**	0.47	ของเหลวหนืดสีเทาดำมีของแข็งสีขาว
H11.3	0.22	ของเหลวหนืดสีดำ
H11.4	0.06	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2.1 สารกลุ่ม H11.1 มีลักษณะของเหลวหนืดสีเหลืองมีของแข็งสีขาวผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 160 mg เรียกว่าสารประกอบ A นำสารประกอบ A ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 17)

2.2 สารกลุ่ม H11.2 มีลักษณะของเหลวหนืดสีเทาดำมีของแข็งสีขาวผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc/hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 110 mg เรียกว่าสารประกอบ B นำสารประกอบ B ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 17)

3. นำสารกลุ่ม H13 หนัก 2.5 g มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel หนัก 125 g เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย CHCl_3 :EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน CHCl_3 ความเข้มข้น (v/v) 10% 20% 50% และใช้ 100% EtOAc เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 3) และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่าสารกลุ่ม H13.3 และ H13.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 19) จึงนำสารกลุ่ม H13.4 ที่มีของแข็งผสมอยู่มาแยกต่อ ส่วน H13.3 เมื่อทดสอบด้วย TLC พบว่ามีองค์ประกอบจำนวนที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกต่อได้

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม H13

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H13.1	0.02	ของเหลวหนืดสีเหลือง
H13.2	0.38	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
H13.3*	0.87	ของเหลวหนืดสีเขียว
H13.4*	0.84	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งสีขาว

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ

3.1 สารกลุ่ม H13.4 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลของแข็งสีขาวผสม จึงนำสาร H13.4 หนัก 0.8 g มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm บรรจุ silica gel หนัก 50 g เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย CHCl_3 :EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน CHCl_3 ความเข้มข้น (v/v) 5% 10% และ 20% ตามลำดับ เก็บสารละลายที่

ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 40 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันได้สารจำนวน 5 กลุ่ม (ตาราง 4) และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 21) สารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 H13.4.4 และ H13.4.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น แต่สารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 และ H13.4.4 มีปริมาณน้อยไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้จึงนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50} สารกลุ่ม H13.4.5 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดและมีของแข็งผสมจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม H13.4

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H13.4.1*	0.18	ของเหลวหนืดสีขาว
H13.4.2	0.10	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
H13.4.3*	0.12	ของเหลวหนืดสีเหลือง
H13.4.4*	0.07	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
H13.4.5*	0.08	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลืองมีของแข็ง

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ

3.1.1 สารกลุ่ม H13.4.5 มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเหลืองของแข็งสีขาวผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 15 mg เรียกว่าสารประกอบ C นำสารประกอบ C ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 23)

4. นำสารกลุ่ม H14 หนัก 2.4 g มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel หนัก 150 g เป็นตัวดูดซับ ละลายด้วย hexane:EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน hexane ความเข้มข้น (v/v) 10% 20% 30% 50% และใช้ 100% EtOAc เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 5) และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 24) สารทุกกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ สารกลุ่ม H14.2 และ H14.3 เป็นของแข็งจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม H14

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H14.1	0.790	ของเหลวหนืดสีเหลือง
H14.2**	0.390	ของแข็งสีขาว
H14.3**	0.470	ของแข็งสีขาว
H14.4	0.660	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง

หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

4.1 สารกลุ่ม H14.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเป็นสารไม่บริสุทธิ์ จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 72 mg เรียกว่าสารประกอบ D นำสารประกอบ D ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 25)

4.2 สารกลุ่ม H14.3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเป็นสารไม่บริสุทธิ์ จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 97 mg เรียกว่าสารประกอบ E นำสารประกอบ E ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 25)

5. นำสารกลุ่ม H15 หนัก 1.5 g มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel หนัก 100 g เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย hexane:EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน hexane ความเข้มข้น (v/v) 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90% และใช้ 100% EtOAc เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 40 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันได้สารจำนวน 6 กลุ่ม (ตาราง 6) สารกลุ่ม H15.4 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อนมีของแข็งผสมจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

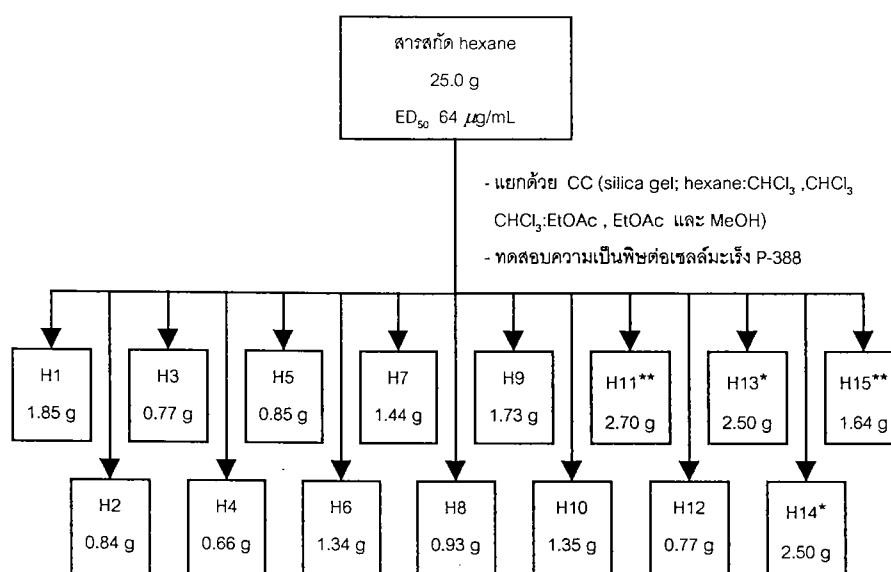
ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม H15

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
H15.1	0.250	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง
H15.2	0.075	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง
H15.3	0.070	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
H15.4**	0.120	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อนมีของแข็งสีขาว
H15.5	0.130	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
H15.6	0.225	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

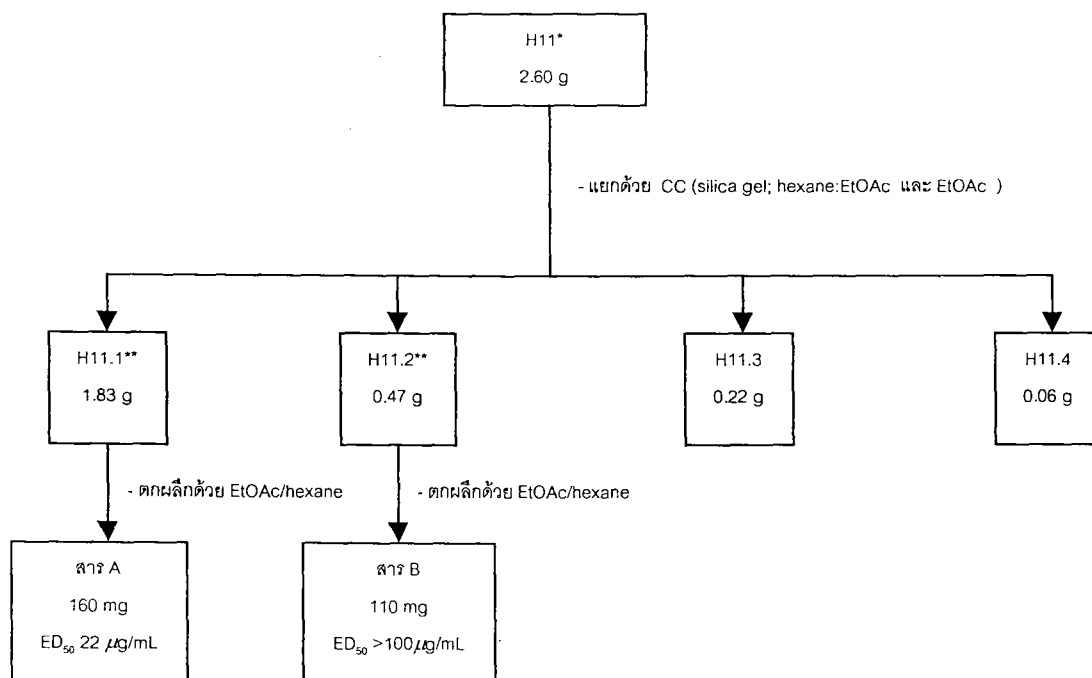
หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

5.1 สารกลุ่ม H15.4 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อนมีของแข็งสีขาวผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 23 mg เรียกว่า สารประกอบ F นำสารประกอบ F ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 26)

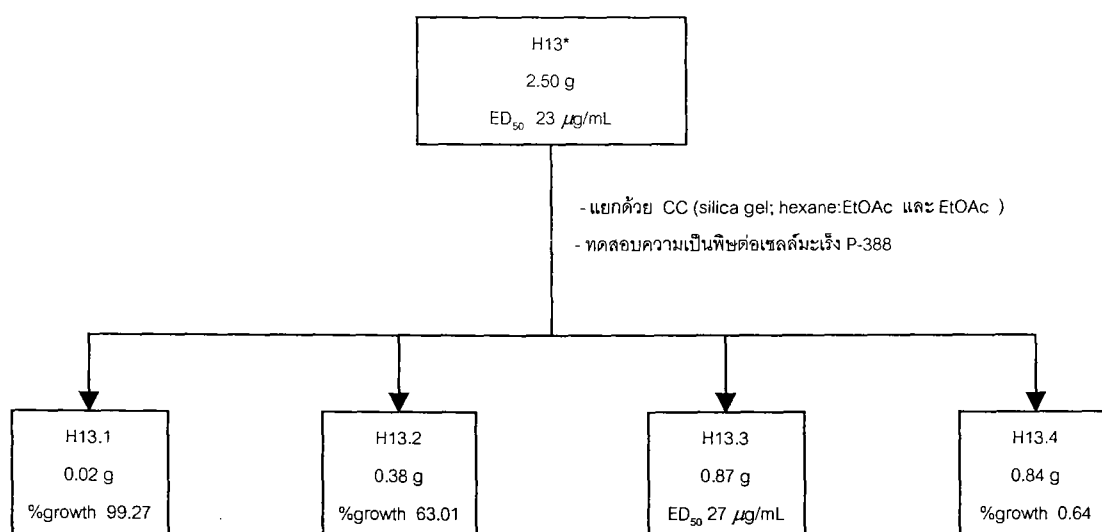
แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารแต่ละกลุ่มที่ได้จากสารสกัด hexane แสดงในภาพประกอบ 11-16



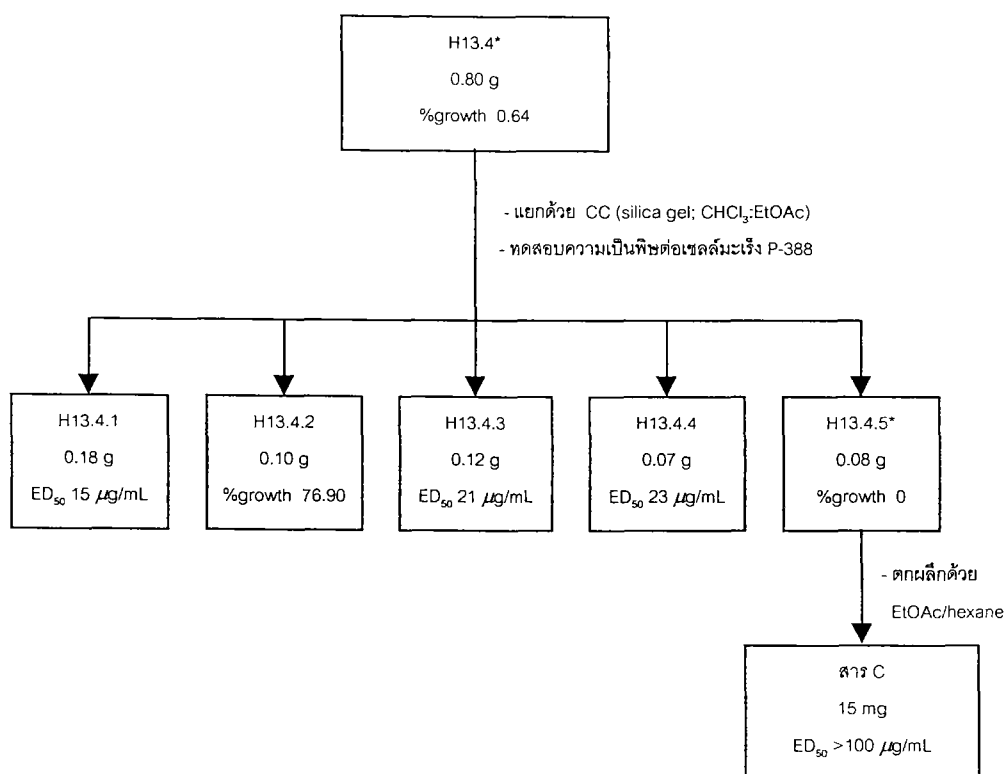
ภาพประกอบ 11 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane



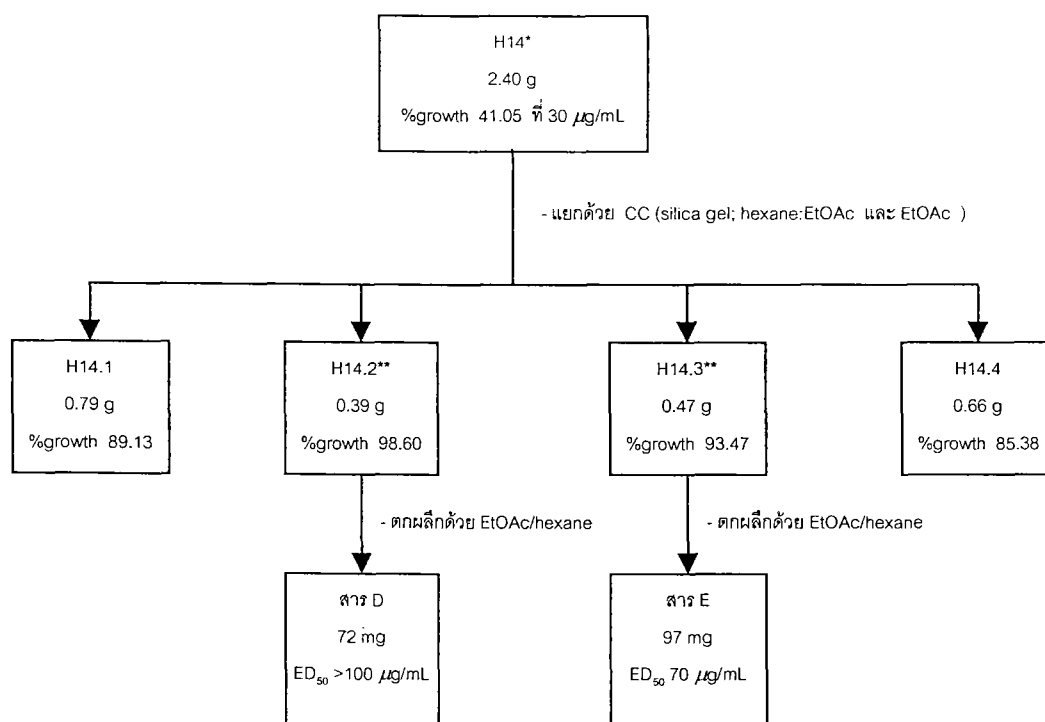
ภาพประกอบ 12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H11



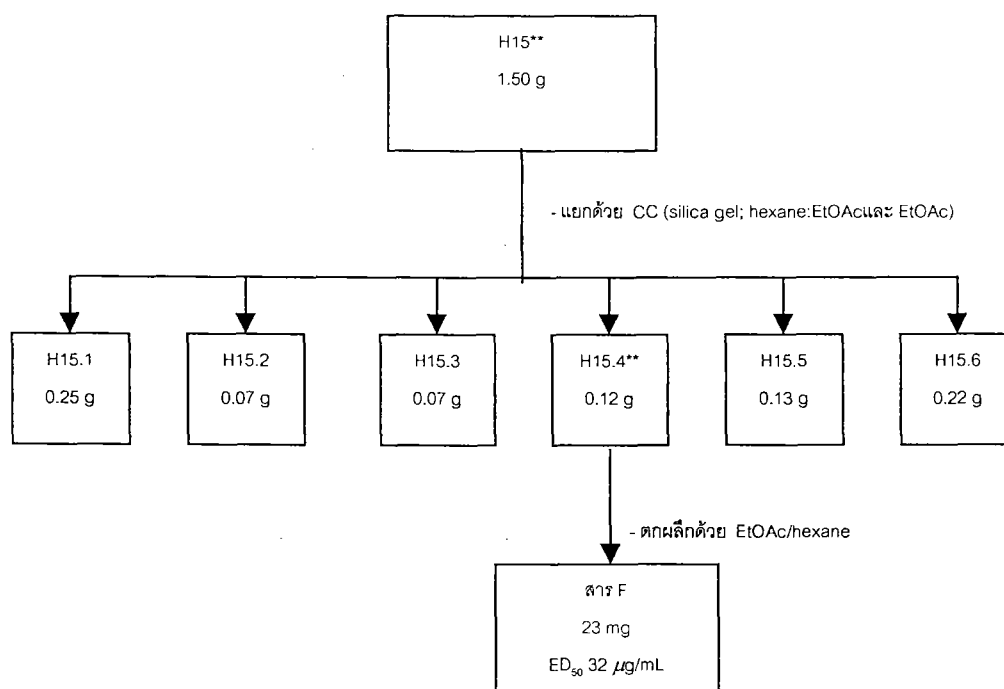
ภาพประกอบ 13 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H13



ภาพประกอบ 14 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H13.4



ภาพประกอบ 15 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H14



หมายเหตุ *กลุ่มสารที่เป็นพิษ **กลุ่มสารที่มีของแข็งผสม

ภาพประกอบ 16 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H15

ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2 และการทำสารให้บริสุทธิ์

1. นำสารสกัด CH_2Cl_2 หนัก 65 g มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm บรรจุ silica gel หนัก 850 g เป็นตัวดูดซับ ะด้วยตัวทำละลาย hexane: CHCl_3 CHCl_3 CHCl_3 :EtOAc EtOAc:MeOH ตามสัดส่วนที่ปรากฏในตาราง 7 เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 65 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 6 กลุ่ม (ตาราง 7) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม D5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 27) จึงนำสารกลุ่ม D5 มาแยกต่อ

ตาราง 7 ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2

สารกลุ่ม	ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D1	hecane: CHCl_3 (20:80)	2.34	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
D2	hecane: CHCl_3 (20:80)	1.53	ของเหลวหนืดสีเหลือง
D3	CHCl_3 (100%)	6.84	ของเหลวหนืดสีส้ม
D4	CHCl_3 :EtOAc (75:25)	11.79	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
D5*	CHCl_3 :EtOAc (50:50)	8.07	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
D6	EtOAc:MeOH (75:25)	29.70	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ

2. นำสารกลุ่ม D5 น้ำหนัก 8 g มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel น้ำหนัก 200 g เป็นตัวดูดซับ ะด้วยตัวทำละลาย CHCl_3 :EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน CHCl_3 ความเข้มข้น (v/v) 10% 20% 40% และใช้ 100% EtOAc เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 8) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 28) สารกลุ่ม D5.2 D5.3 และ D5.4 มีความเป็นพิษมากกว่ากลุ่มอื่น จึงนำสารกลุ่ม D5.2 และ D5.3 มาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม D5.4 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล และมีปริมาณน้อยจึงนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50} เท่านั้น เนื่องจากสารกลุ่ม D5.1 เป็นของเหลวหนืดสีเขียวมีของแข็งผสมจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม D5

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.1**	1.22	ของเหลวหนืดสีเขียวมีของแข็งสีขาว
D5.2*	3.84	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งสีขาว
D5.3*	1.58	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
D5.4	0.93	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2.1 สารกลุ่ม D5.1 น้ำหนัก 1.22 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวมีของแข็งสีขาวผสม จึงนำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel น้ำหนัก 120 g เป็นตัวดูดซับ สะดด้วยตัวทำละลาย hexane:EtOAc โดยใช้ EtOAc ใน hexane ความเข้มข้น (v/v) 5% 10% 20% 40% และใช้ 100% EtOAc เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 9) สารกลุ่ม D5.1.1 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อนมีของแข็งสีขาวผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย MeOH กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 108 mg เรียกว่าสารประกอบ G นำสารประกอบ G ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 29)

ตาราง 9 ผลการแยกสารกลุ่ม D5.1

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.1.1**	0.56	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อนมีของแข็งสีขาว
D5.1.2	0.11	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
D5.1.3	0.18	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
D5.1.4	0.13	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2.2 สารกลุ่ม D5.2หนัก 3.80 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งสีขาวผสม มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel หนัก 250 g เป็นตัวดูดซับ สะดด้วยตัวทำละลาย hexane:EtOAc โดยใช้ EtOAc ความเข้มข้น (v/v) 30% ใน hexane เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 5 กลุ่ม (ตาราง 10) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 30) สารกลุ่ม D5.2.3 D5.2.4 และ D5.2.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่นจึงนำมาแยกต่อ สารกลุ่ม D5.2.1 และ D5.2.2 มีของแข็งสีขาวผสมจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.2.1**	0.85	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งสีขาว
D5.2.2**	0.52	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งสีขาว
D5.2.3*	0.97	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
D5.2.4*	0.39	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
D5.2.5*	0.36	ของเหลวหนืดสีดำ

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2.2.1 สารกลุ่ม D5.2.1 หนัก 0.85 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 37 mg เรียกว่าสารประกอบ H นำสารประกอบ H ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับ D ในสารสกัด hexane

2.2.2 สารกลุ่ม D5.2.2 หนัก 0.52 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 68 mg เรียกว่าสารประกอบ I นำสารประกอบ I ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 31)

2.2.3 สารกลุ่ม D5.2.3 น้หนัก 0.97 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel น้หนัก 200 g เป็นตัวดูดซับ ะด้วยตัวทำละลาย hexane:EtOAc โดยใช้ EtOAc ความเข้มข้น (v/v) 10% ใน hexane เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันได้สารจำนวน 3 กลุ่ม (ตาราง 11) สารที่แยกได้มีปริมาณน้อยจึงสารกลุ่ม D5.2.3.1 D5.2.3.2 และ D5.2.3.3 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ตาราง 32) เพื่อหาค่า ED₅₀ สารกลุ่ม D5.2.3.2 มีของแข็งสีขาวผสมจึงนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 11 ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2.3

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.2.3.1	0.05	ของเหลวหนืดสีเหลือง
D5.2.3.2**	0.47	ของเหลวหนืดสีเหลืองมีของแข็งสีขาว
D5.2.3.3	0.14	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2.2.3.1 สารกลุ่ม D5.2.3.2 น้หนัก 0.47 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองมีของแข็งผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึกสีขาวหนัก 54 mg เรียกว่าสารประกอบ J นำสารประกอบ J ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับ E ในสารสกัด hexane

2.2.4 สารกลุ่ม D5.2.4 น้หนัก 0.39 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล เข้ม มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm บรรจุ silica gel น้หนัก 40 g เป็นตัวดูดซับ ะด้วยตัวทำละลาย CHCl₃:EtOAc โดยใช้ EtOAc ความเข้มข้น (v/v) 20% ใน CHCl₃ เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 10 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 12) สารที่แยกได้แต่ละกลุ่มมีปริมาณน้อยจึงนำสารทุกกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 33) เพื่อหาค่า ED₅₀

ตาราง 12 ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2.4

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.2.4.1	0.02	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
D5.2.4.2	0.08	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
D5.2.4.3	0.08	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
D5.2.4.4	0.03	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

2.2.5 สารกลุ่ม D5.2.5 น้ำหนัก 0.36 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีดำ มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm บรรจุ silica gel น้ำหนัก 40 g เป็นตัวดูดซับ ะด้วยตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ โดยใช้ EtOAc ความเข้มข้น (v/v) 20% ใน CHCl_3 เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 10 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 4 กลุ่ม (ตาราง 13) สารกลุ่ม D5.2.5.2 มีของแข็งสีขาวผสมจึงนำมาแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ส่วนสารอีก 3 กลุ่มคือ D5.2.5.1 D5.2.5.3 และ D5.2.5.4 มีปริมาณน้อยจึงนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 34) เพื่อหาค่า ED_{50}

ตาราง 13 ผลการแยกสารกลุ่ม D5.2.5

สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.2.5.1	0.02	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
D5.2.5.2 **	0.17	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลืองมีของแข็งสีขาว
D5.2.5.3	0.08	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
D5.2.5.4	0.10	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

2.2.5.1 สารกลุ่ม D5.2.5.2 น้ำหนัก 0.17 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลืองมีของแข็งผสม จึงนำมาตกผลึกด้วย EtOAc:hexane กรองและทำผลึกให้แห้งได้ผลึก สีขาวหนัก 48 mg เรียกว่าสารประกอบ K นำสารประกอบ K ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 35)

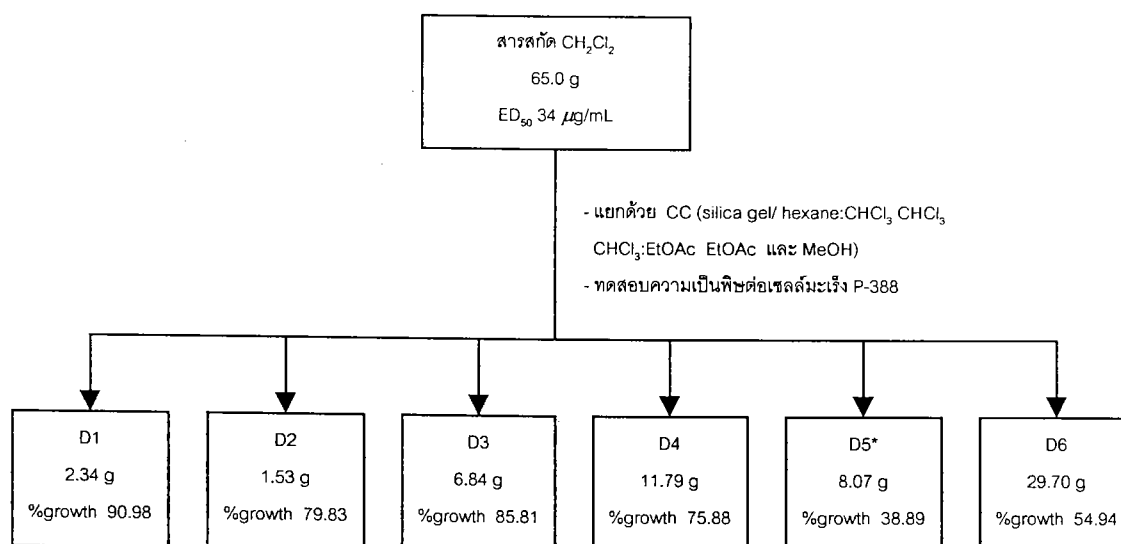
2.3 สารกลุ่ม D5.3 น้หนัก 1.58 g มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล มาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm บรรจุ silica gel น้หนัก 180 g เป็นตัวดูดซับ ละด้วยตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ โดยใช้ EtOAc ความเข้มข้น (v/v) 20% ใน CHCl_3 เก็บสารละลายที่ผ่านตัวดูดซับครั้งละประมาณ 50 mL ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกัน ได้สารจำนวน 3 กลุ่ม (ตาราง 14) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 36) เพื่อหาค่า ED_{50}

ตาราง 14 ผลการแยกสารกลุ่ม D5.3

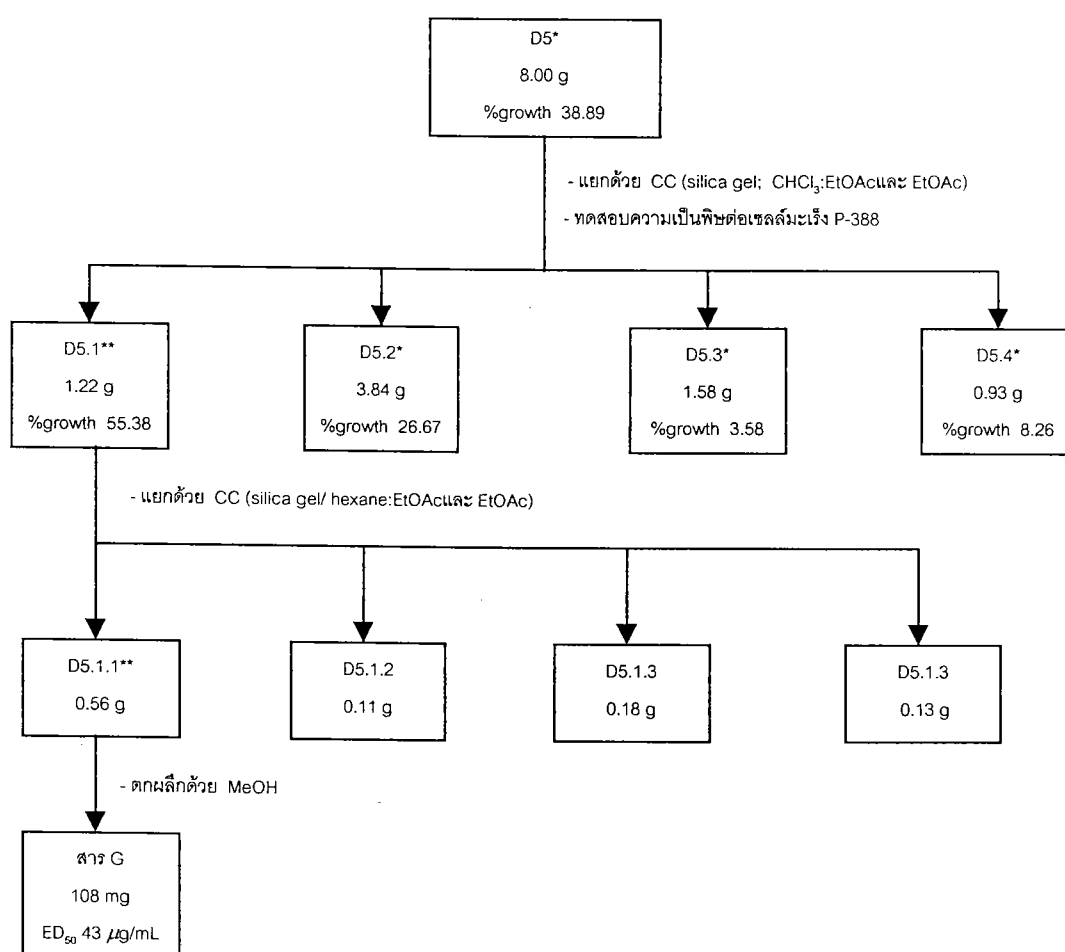
สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
D5.3.1	0.04	ของเหลวหนืดสีเขียว
D5.3.2	0.72	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ
D5.3.3	0.42	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

2.4 สารกลุ่ม D5.4 น้หนัก 0.93 g เมื่อทดสอบด้วย TLC พบว่ามีองค์ประกอบจำนวนมากที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกกลุ่มสารได้หลังผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และไม่สามารถนำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อไปได้

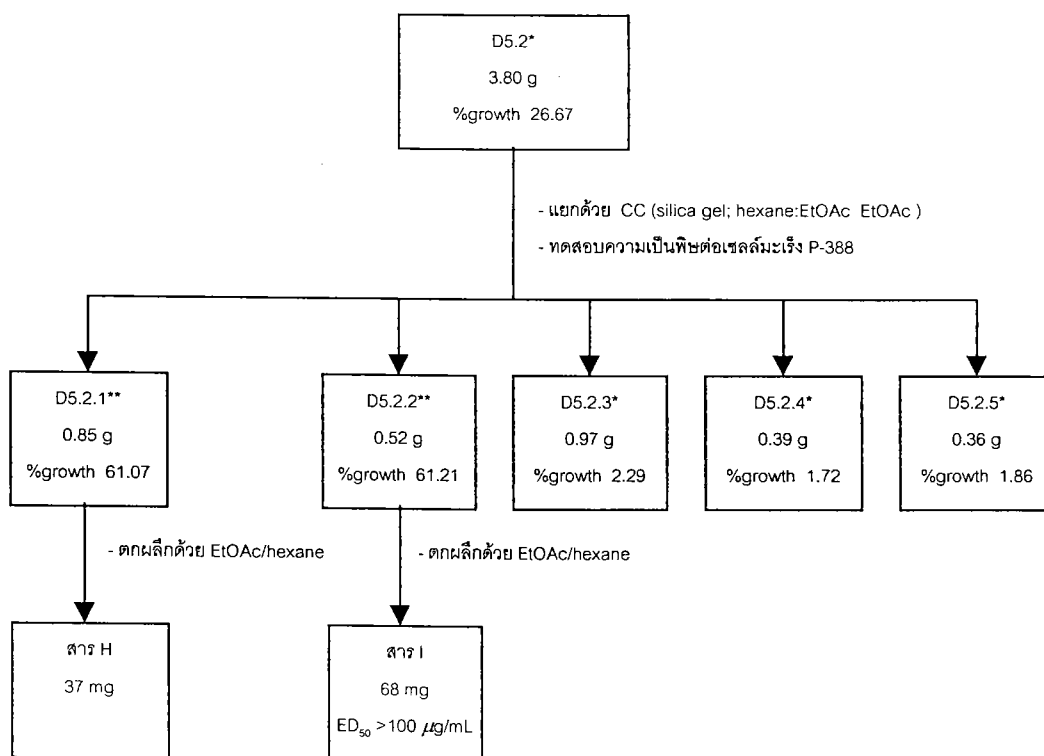
แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารแต่ละกลุ่มที่ได้จากสารสกัด CHCl_3 แสดงในภาพประกอบ 17-23



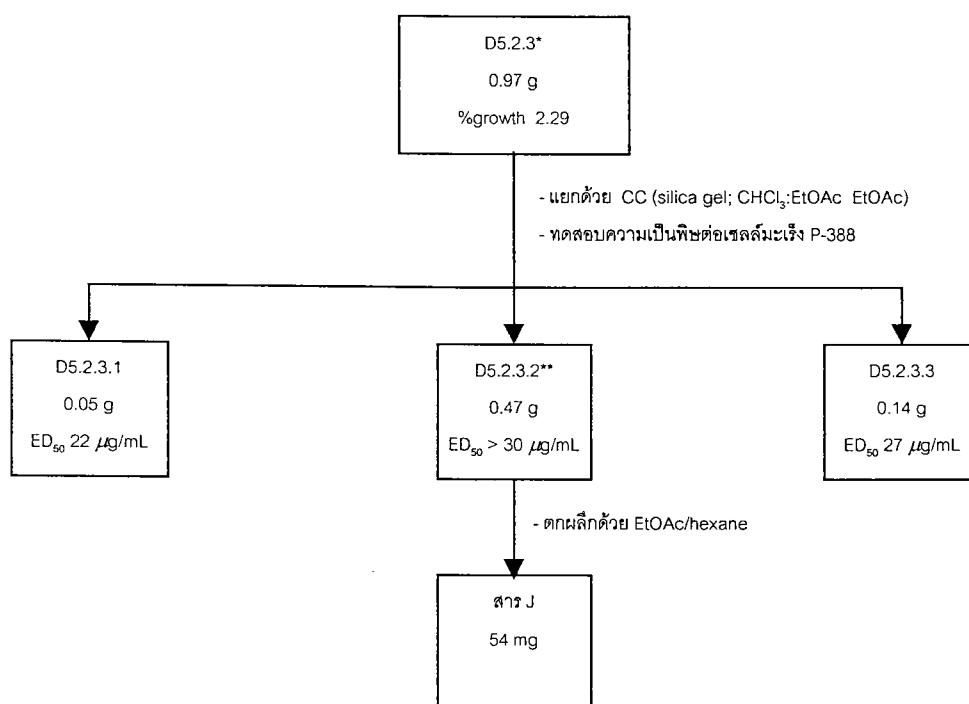
ภาพประกอบ 17 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด CH_2Cl_2



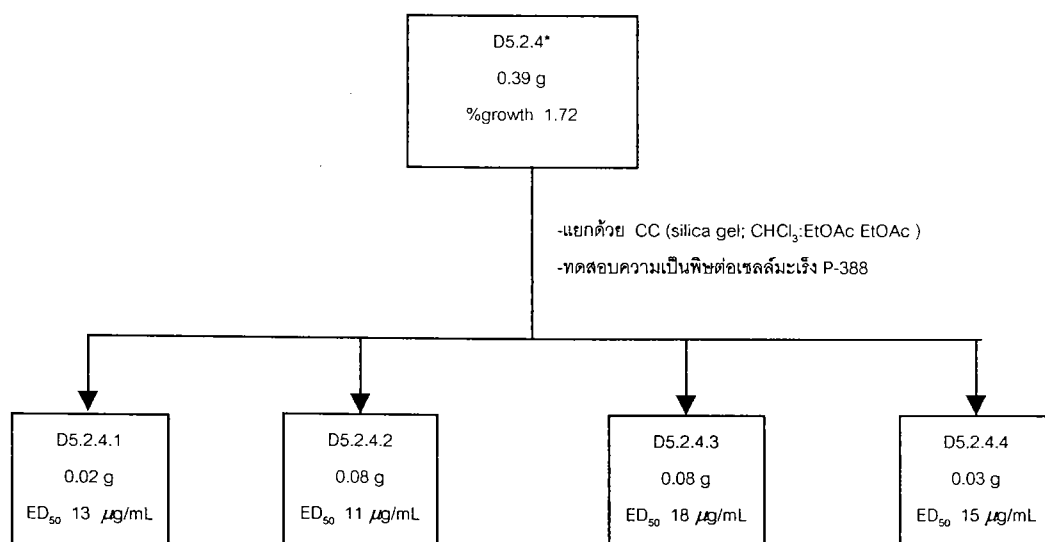
ภาพประกอบ 18 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5



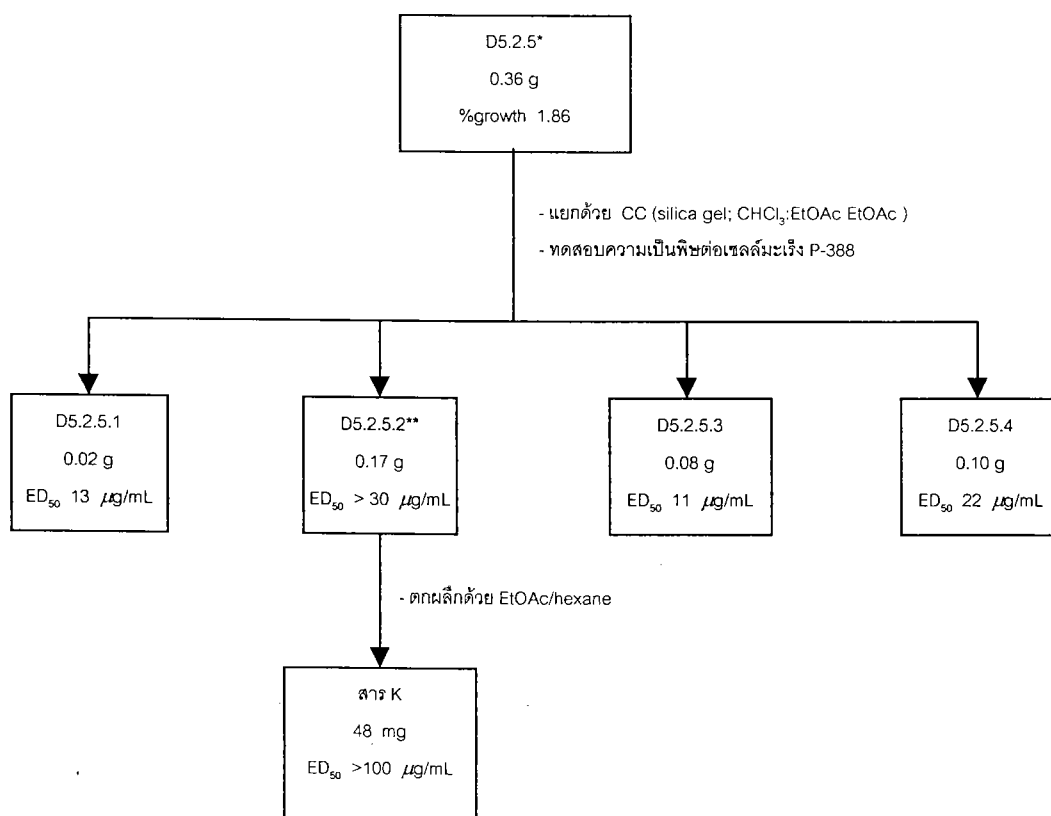
ภาพประกอบ 19 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2



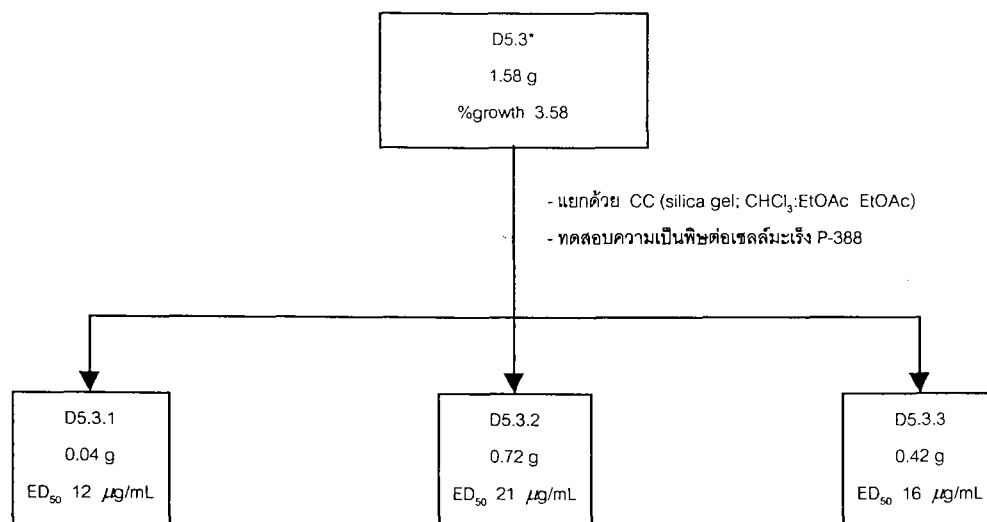
ภาพประกอบ 20 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2.3



ภาพประกอบ 21 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2.4



ภาพประกอบ 22 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.2.5



หมายเหตุ *กลุ่มสารที่เป็นพิษ **กลุ่มสารที่มีของแข็งผสม

ภาพประกอบ 23 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม D5.3

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388

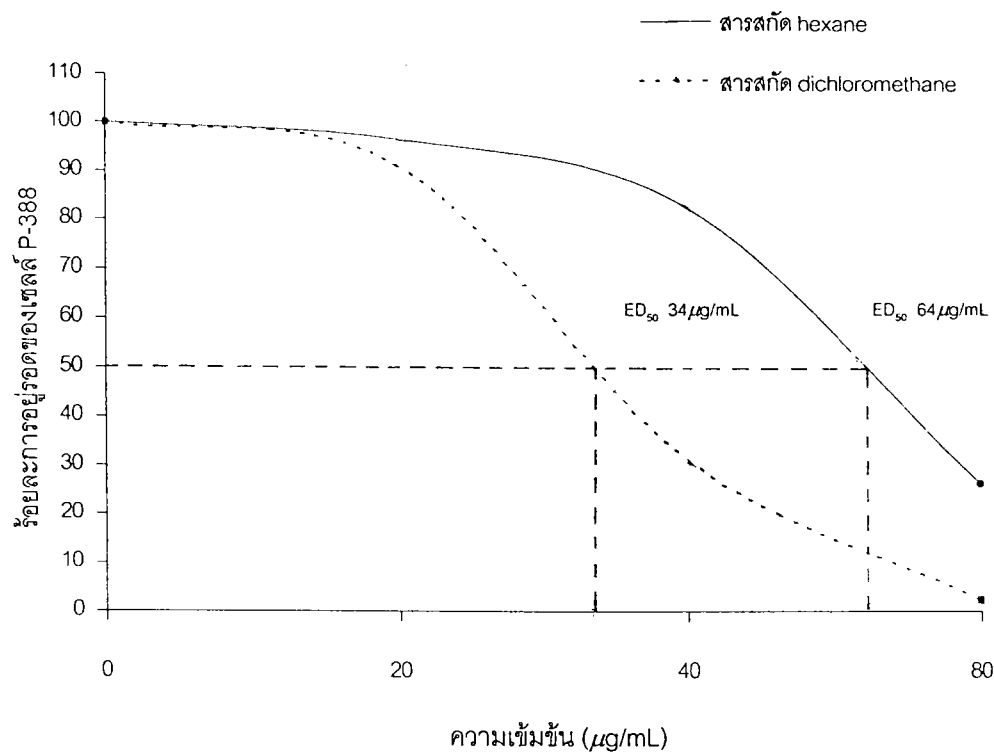
1. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 ทดสอบที่ความเข้มข้น 20 40 และ 80 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากการสุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 15

ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388	
			ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	5.48×10^5	5.36×10^5	5.42×10^5	100.00
hexane	20	5.00×10^4	5.12×10^5	5.12×10^5	5.12×10^5	94.46
	40	5.00×10^4	4.46×10^5	4.50×10^5	4.48×10^5	82.65
	80	5.00×10^4	1.40×10^5	1.44×10^5	1.42×10^5	26.19
CH_2Cl_2	20	5.00×10^4	5.06×10^5	5.04×10^5	5.05×10^5	93.17
	40	5.00×10^4	1.70×10^5	1.68×10^5	1.69×10^5	31.18
	80	5.00×10^4	1.40×10^5	1.20×10^5	1.30×10^5	2.39

นำผลค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2 เท่ากับ 64 และ 34 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2

2. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane

นำสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด hexane มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตาราง 16

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก
สารสกัด hexane

สารกลุ่ม	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)			ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
H1	5.04×10^4	6.84×10^6	7.12×10^6	6.98×10^6	99.39
H2	5.04×10^4	7.18×10^6	7.04×10^6	7.11×10^6	101.24
H3	5.04×10^4	4.94×10^6	5.18×10^6	5.06×10^6	72.05
H4	5.04×10^4	5.24×10^6	5.04×10^6	5.14×10^6	73.19
H5	5.04×10^4	4.90×10^6	5.02×10^6	4.96×10^6	70.63
H6	5.04×10^4	6.74×10^6	6.54×10^6	6.64×10^6	94.55
H7	5.04×10^4	6.96×10^6	7.16×10^6	7.06×10^6	100.53
H8	5.05×10^4	5.80×10^6	6.20×10^6	6.00×10^6	118.56
H9	5.05×10^4	4.60×10^6	4.20×10^6	4.40×10^6	86.94
H10	5.05×10^4	4.80×10^6	4.32×10^6	4.56×10^6	90.10
H11**	5.05×10^4	4.12×10^6	4.20×10^6	4.16×10^6	82.20
H12	5.05×10^4	5.00×10^6	5.24×10^6	5.12×10^6	101.17
H13*	5.11×10^4	2.00×10^5	2.40×10^5	2.20×10^5	4.05
H14*	5.11×10^4	2.12×10^6	2.32×10^6	2.23×10^6	41.05
H15**	5.11×10^4	5.32×10^6	4.98×10^6	5.15×10^6	94.81

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

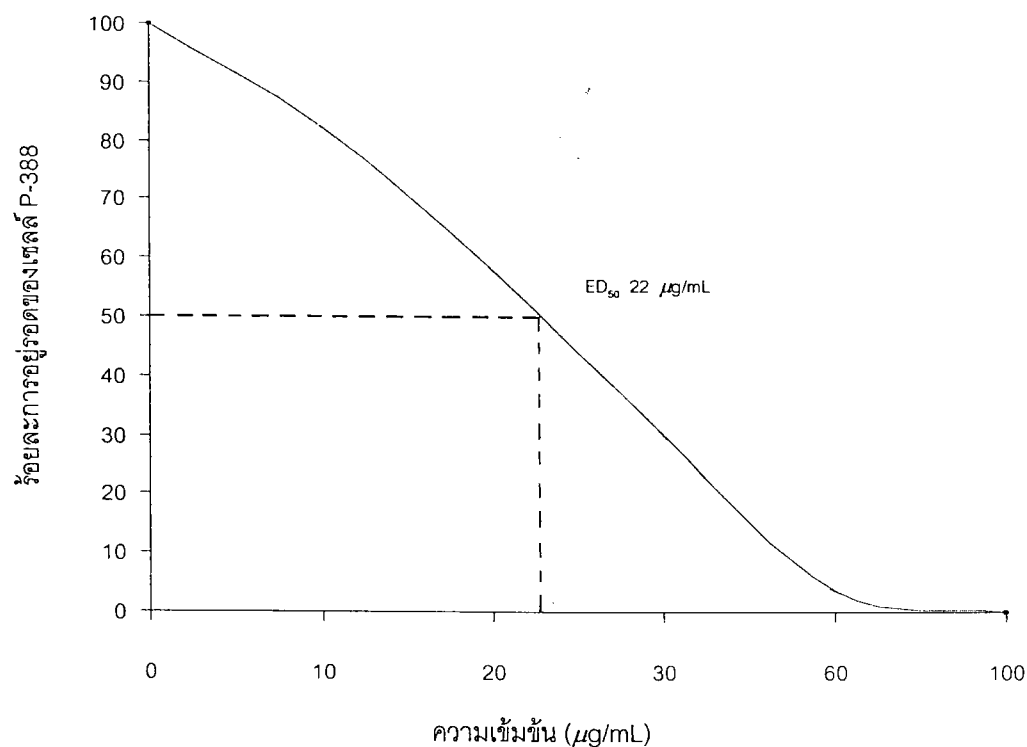
2.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสาร กลุ่ม H11

เนื่องจากส่วนที่ H11 มีของแข็งผสมอยู่เมื่อตกผลึกได้สารประกอบบริสุทธิ์ A และ B เมื่อนำสารประกอบ A และ B มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 10 20 30 60 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงใน ตาราง 17

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ A และ B

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	6.52×10^6	6.40×10^6	6.46×10^6	100.00
สารประกอบ A	10	5.00×10^4	5.50×10^6	5.48×10^6	5.49×10^6	84.93
	20	5.00×10^4	3.46×10^6	3.54×10^6	3.50×10^6	54.14
	30	5.00×10^4	2.16×10^6	2.18×10^6	2.17×10^6	33.56
	60	5.00×10^4	6.00×10^4	4.00×10^4	5.00×10^4	0.77
	100	5.00×10^4	0	0	0	0.00
สารประกอบ B	10	5.00×10^4	7.56×10^6	7.60×10^6	7.58×10^6	117.26
	20	5.00×10^4	7.48×10^6	7.36×10^6	7.42×10^6	114.78
	30	5.00×10^4	6.98×10^6	7.10×10^6	7.04×10^6	108.90
	60	5.00×10^4	7.02×10^6	6.98×10^6	7.00×10^6	108.29
	100	5.00×10^4	6.96×10^6	7.04×10^6	7.00×10^6	108.29

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารประกอบ A และ B มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารประกอบ A เท่ากับ $22 \mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 25 ส่วนสารประกอบ B มีค่ามากกว่า $100 \mu\text{g/mL}$



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงค่าความล้มพันร้อยละการยับยั้งของเซลล์มะเร็ง P-388
กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ A

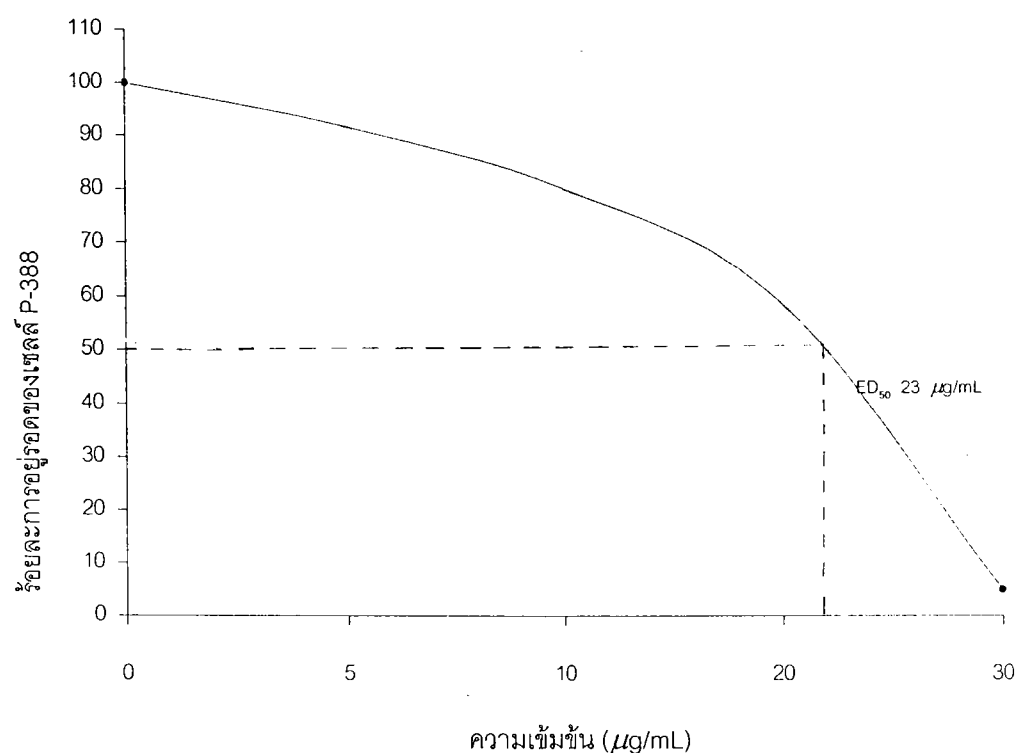
2.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H13

นำสารกลุ่ม H13 ที่แยกได้จากสารสกัด hexane ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H13

สารกลุ่ม	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.11×10^4	5.16×10^5	4.96×10^5	5.06×10^5	100.00
H13	5	5.11×10^4	4.60×10^5	4.68×10^5	4.64×10^5	91.68
	10	5.11×10^4	3.80×10^5	3.36×10^5	3.58×10^5	70.74
	20	5.11×10^4	2.76×10^5	3.20×10^5	2.98×10^5	58.88
	30	5.11×10^4	2.40×10^5	2.60×10^5	2.50×10^5	4.94

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม H13 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารกลุ่ม H13 เท่ากับ 23 $\mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม H13

นำสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม H13 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 19

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม H13

สารกลุ่ม	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388	
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
H13.1	5.04×10^4	7.88×10^6	7.56×10^6	7.72×10^6	99.35
H13.2	5.05×10^4	5.04×10^6	4.76×10^6	4.90×10^6	63.06
H13.3*	5.05×10^4	1.94×10^6	1.90×10^6	1.92×10^6	24.71
H13.4*	5.05×10^4	6.00×10^4	4.00×10^4	5.00×10^4	0.64

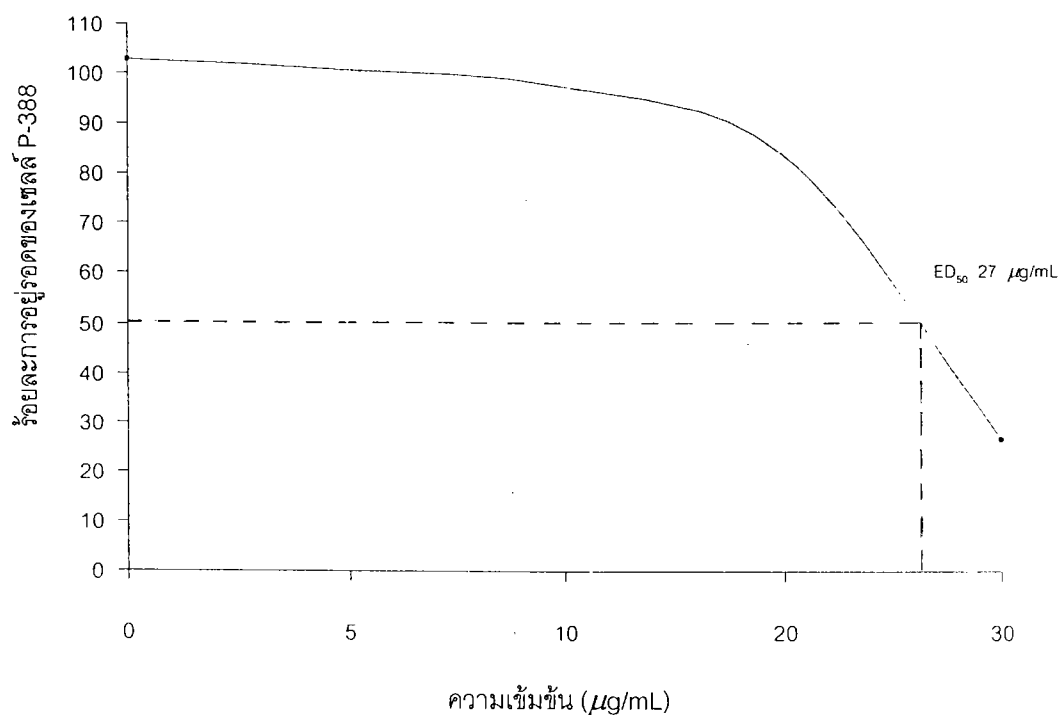
หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ

สารกลุ่ม H13.3 ซึ่งมีค่าร้อยละของการอยู่รอดที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ เท่ากับ 24.71 นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50} โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 20

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H13.3

สารกลุ่ม	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	7.38×10^6	7.40×10^6	7.39×10^6	100.00
H13.3	5	5.00×10^4	7.68×10^6	7.44×10^6	7.56×10^6	102.28
	10	5.00×10^4	7.34×10^6	7.50×10^6	7.42×10^6	100.39
	20	5.00×10^4	6.52×10^6	6.88×10^6	6.70×10^6	90.65
	30	5.00×10^4	1.90×10^6	2.06×10^6	1.98×10^6	26.78

เมื่อนำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม H13.3 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารกลุ่ม H13.3 เท่ากับ $27 \mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม H13.3

สารกลุ่ม H13.4 เมื่อนำมาแยกต่อได้ 5 ส่วน คือ H13.4.1 - H13.4.5 นำสารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.2 H13.4.3 H13.4.4 และ H13.4.5 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 21

ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก

สารกลุ่ม H13.4

สารกลุ่ม	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388	
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
H13.4.1	5.05×10^4	4.00×10^4	2.00×10^4	3.00×10^4	0.38
H13.4.2	5.05×10^4	6.12×10^6	5.98×10^6	6.05×10^6	76.90
H13.4.3	5.05×10^4	0	0	0	0.00
H13.4.4	5.05×10^4	0	0	0	0.00
H13.4.5**	5.05×10^4	0	0	0	0.00

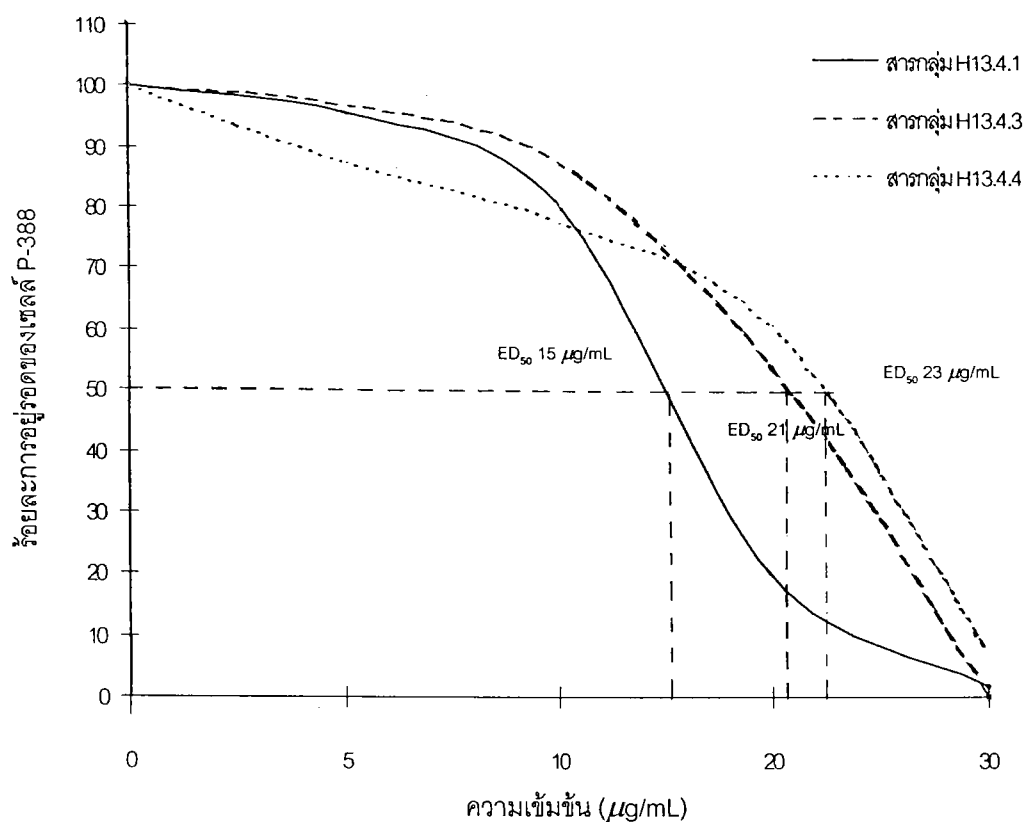
หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

เมื่อนำสารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 และ 13.4.4 นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50} โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 22 ส่วน H13.4.5 ซึ่งเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลืองมีของแข็งผสมนำมาตกผลึก ได้สารประกอบ C แล้วจึงนำสารประกอบ C มาทดสอบความเป็นพิษผลดังตาราง 23

ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก
สารกลุ่ม H13.4

สารกลุ่ม	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	7.38×10^6	7.40×10^6	7.39×10^6	100.00
H13.4.1	5	5.00×10^4	7.18×10^6	6.98×10^6	7.08×10^6	94.51
	10	5.00×10^4	5.38×10^6	5.26×10^6	5.32×10^6	81.66
	20	5.00×10^4	1.14×10^6	1.26×10^6	1.20×10^6	18.42
	30	5.00×10^4	1.00×10^5	1.40×10^5	1.20×10^5	1.84
	0	5.00×10^4	6.94×10^6	6.94×10^6	6.94×10^6	100.00
H13.4.3	5	5.00×10^4	6.22×10^6	6.24×10^6	6.23×10^6	89.71
	10	5.00×10^4	6.10×10^6	6.12×10^6	6.11×10^6	87.98
	20	5.00×10^4	3.68×10^6	3.78×10^6	3.73×10^6	53.71
	30	5.00×10^4	0	0	0	0.00
	0	5.00×10^4	5.78×10^6	5.86×10^6	5.82×10^6	83.80
H13.4.4	5	5.00×10^4	4.62×10^6	4.70×10^6	4.66×10^6	67.10
	10	5.00×10^4	4.18×10^6	4.22×10^6	4.20×10^6	60.48
	20	5.00×10^4	6.00×10^4	4.00×10^4	5.00×10^4	7.20
	30	5.00×10^4				

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 และ H13.4.4 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 และ H13.4.4 เท่ากับ 15 21 และ 23 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 28



ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม H13.4.1 H13.4.3 H13.4.4

สารประกอบ C ที่แยกได้จากส่วน H13.4.5 เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ พบว่ามีความเป็นพิษต่ำแต่เนื่องจากสารประกอบ C เป็นของแข็งจึงนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 25 50 และ $100 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 23 พบว่าสารประกอบ C มีค่า $\text{ED}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ C

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4			
			ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	0	5.01×10^4	5.34×10^5	5.30×10^5	5.32×10^5	100.00
สารประกอบ C	25	5.01×10^4	4.74×10^5	4.76×10^5	4.75×10^5	89.25
	50	5.01×10^4	4.22×10^5	4.28×10^5	4.25×10^5	79.85
	100	5.01×10^4	3.88×10^5	3.80×10^5	3.84×10^5	72.15

2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H14

นำสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม H14 (H14.1 – H14.4) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าสารที่แยกได้ในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำดังแสดงในตาราง 24

ตาราง 24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม H14

สาร	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)			ร้อยละการอยู่รอด	
		วันที่ 4			ของเซลล์มะเร็ง P-388	
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย		
H14.1	5.00×10^4	4.52×10^5	4.52×10^5	4.52×10^5		89.13
H14.2**	5.00×10^4	4.98×10^5	5.02×10^5	5.00×10^5		98.60
H14.3**	5.00×10^4	4.72×10^5	4.76×10^5	4.74×10^5		93.47
H14.4	5.00×10^4	4.34×10^5	4.32×10^5	4.33×10^5		85.38

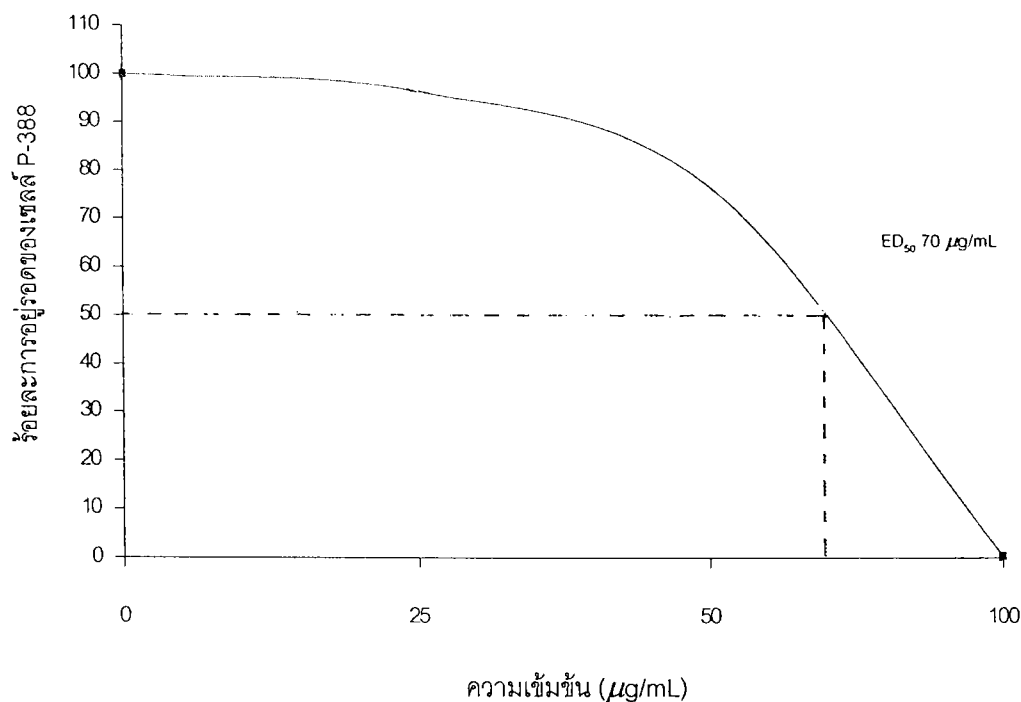
หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

เนื่องจากสารส่วน H14.2 และ H14.3 เป็นของเหลวที่มีของแข็งปนอยู่ เมื่อนำมาตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ D และ E จึงนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมดังตาราง 25

ตาราง 25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ D และ E

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)			ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388	
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.01×10^4	5.34×10^6	5.30×10^6	5.32×10^6	100.00
สารประกอบ D	25	5.01×10^4	5.46×10^6	5.46×10^6	5.46×10^6	102.59
	50	5.01×10^4	4.92×10^6	4.98×10^6	4.95×10^6	93.01
	100	5.01×10^4	4.86×10^6	4.90×10^6	4.88×10^6	91.69
สารประกอบ E	25	5.01×10^4	4.88×10^6	4.88×10^6	4.88×10^6	91.69
	50	5.01×10^4	4.48×10^6	4.40×10^6	4.44×10^6	83.42
	100	5.01×10^4	1.23×10^4	1.22×10^4	2.45×10^4	0.46

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารประกอบ E มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้หาค่า ED_{50} (จากกราฟ) สารประกอบ E เท่ากับ 70 $\mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 29 ส่วนสารประกอบ D มีค่า $\text{ED}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$



ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ E

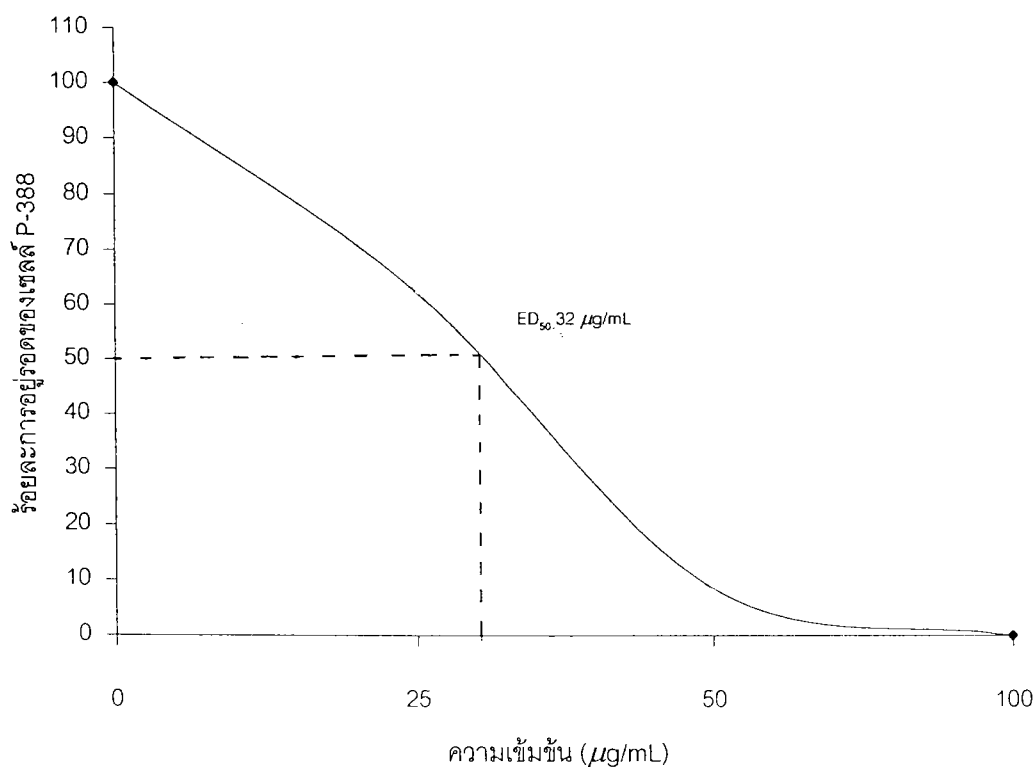
2.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม H15

เนื่องจากสารกลุ่ม H15 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ต่ำ (ตาราง 16) แต่ในส่วน H15.4 ที่แยกจากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีมีของแข็งผสมอยู่ (ตาราง 6) เมื่อตกผลึกได้ สารประกอบ F จึงนำสารประกอบ F มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 26

ตาราง 26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ F

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย		
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	6.16×10^5	6.24×10^5	6.20×10^5	100.00
สารประกอบ F	25	5.00×10^4	3.96×10^5	3.90×10^5	3.93×10^5	63.35
	50	5.00×10^4	4.60×10^5	4.80×10^5	9.70×10^5	1.56
	100	5.00×10^4	0	0	0	0.00

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารประกอบ F มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารประกอบ F เท่ากับ $32 \mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 30



ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ F

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารสกัด CH_2Cl_2

นำสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด CH_2Cl_2 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมดังตาราง 27 พบว่าสารส่วน D5 มีความเป็นพิษมากกว่าสารกลุ่มอื่นจึงนำมาศึกษาต่อ

ตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารสกัด CH_2Cl_2

สาร	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388	
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
D1	5.04×10^4	6.68×10^6	6.70×10^6	6.69×10^6	90.98
D2	5.04×10^4	5.92×10^6	5.82×10^6	5.87×10^6	79.83
D3	5.04×10^4	6.24×10^6	6.38×10^6	6.31×10^6	85.81
D4	5.04×10^4	5.54×10^6	5.62×10^6	5.58×10^6	75.88
D5*	5.04×10^4	2.82×10^6	2.90×10^6	2.86×10^6	38.89
D6	5.04×10^4	4.00×10^6	4.08×10^6	4.04×10^6	54.94

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ

3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม D5

นำสารกลุ่ม D5.1 D5.2 D5.3 และ D5.4 ที่แยกได้จากสารส่วน D5 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าส่วน D5.2 D5.3 และ D5.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 แสดงในตาราง 28

ตาราง 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม D5

สาร	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388	
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
D5.1**	5.00×10^4	3.56×10^6	3.54×10^6	3.55×10^6	55.38
D5.2*	5.00×10^4	1.74×10^6	1.68×10^6	1.71×10^6	26.67
D5.3*	5.00×10^4	2.40×10^5	2.20×10^5	2.30×10^5	3.58
D5.4*	5.00×10^4	5.00×10^5	5.60×10^5	5.30×10^5	8.26

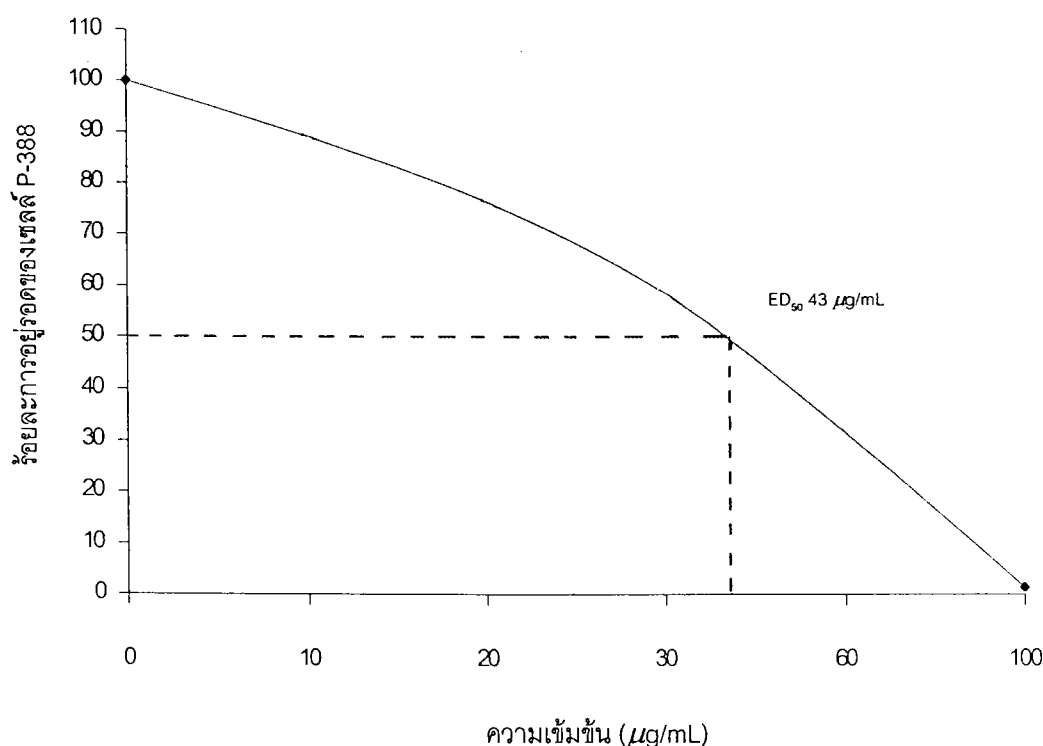
หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

ส่วนของ D5.1 มีลักษณะเป็นของแข็งผสมอยู่เมื่อแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้สารประกอบ G เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 10 20 30 60 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 29

ตาราง 29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ G

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)			ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388	
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	6.52×10^6	6.40×10^6	6.46×10^6	100.00
สารประกอบ G	10	5.00×10^4	4.90×10^6	4.96×10^6	4.93×10^6	75.92
	20	5.00×10^4	4.14×10^6	4.22×10^6	4.18×10^6	64.37
	30	5.00×10^4	3.96×10^6	4.06×10^6	4.01×10^6	61.75
	60	5.00×10^4	1.90×10^6	1.94×10^6	1.92×10^6	29.56
	100	5.00×10^4	8.00×10^4	1.00×10^5	9.00×10^4	1.38

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารประกอบ G มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสารประกอบ G เท่ากับ $43 \mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 31



ภาพประกอบ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารประกอบ G

นำสารกลุ่ม D5.2.1 D5.2.2 D5.2.3 D5.2.4 และ D5.2.5 ที่แยกได้จากกลุ่ม D5.2 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมดังตาราง 30 พบว่า D5.2.3 D5.2.4 และ D5.2.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ในส่วนของ D5.2.1 และ D5.2.2 ถึงแม้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ต่ำ แต่มีของแข็งผสมอยู่ เมื่อนำมาตกผลึก ได้สารประกอบ H จากส่วน D5.2.1 ซึ่งผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับ D ในสารสกัด hexane และ I จากส่วน D5.2.2

ตาราง 30 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม D5.2

สาร	วันเริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388	
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
D5.2.1**	5.01×10^4	4.16×10^6	4.34×10^6	4.25×10^6	61.07
D5.2.2**	5.01×10^4	4.26×10^6	4.26×10^6	4.26×10^6	61.21
D5.2.3*	5.01×10^4	1.80×10^5	1.60×10^5	1.70×10^5	2.29
D5.2.4*	5.01×10^4	1.00×10^5	1.40×10^5	1.20×10^5	1.72
D5.2.5*	5.01×10^4	1.20×10^5	1.40×10^5	1.30×10^5	1.86

หมายเหตุ *สารส่วนที่เป็นพิษ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

เมื่อนำสารประกอบ I มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 10 25 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 31 เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าสารประกอบ I มีค่า $\text{ED}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

ตาราง 31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ I

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)			ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388	
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
		ขวด 1	ขวด 2			
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	6.52×10^6	6.40×10^6	6.46×10^6	100.00
สารประกอบ I	10	5.00×10^4	6.30×10^6	6.42×10^6	6.36×10^6	98.38
	25	5.00×10^4	6.00×10^6	6.24×10^6	6.12×10^6	94.67
	50	5.00×10^4	4.52×10^6	4.64×10^6	4.58×10^6	70.85
	100	5.00×10^4	4.22×10^6	4.26×10^6	4.24×10^6	65.59

นำสารกลุ่ม D5.2.3.1 D5.2.3.2 และ D5.2.3.3 ที่แยกได้จาก D5.2.3 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 32

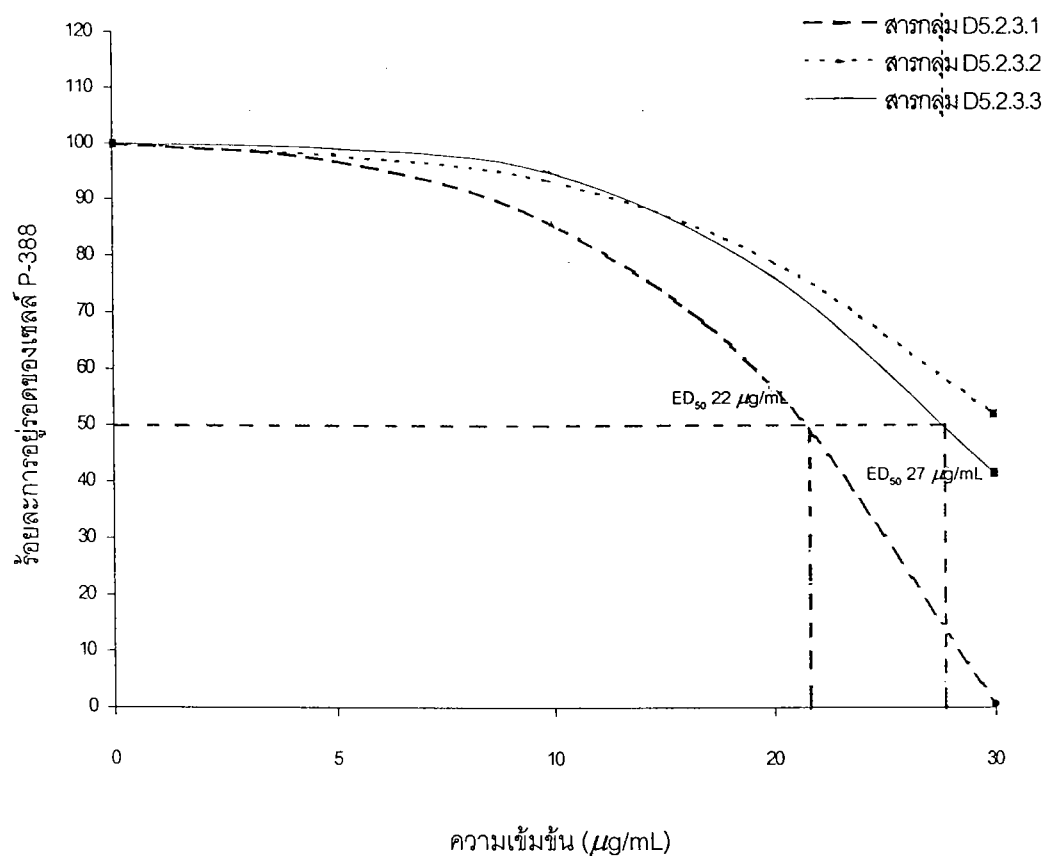
ตาราง 32 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม

D5.2.3

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย		
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	6.56×10^6	6.62×10^6	6.59×10^6	100.00
D5.2.3.1	5	5.00×10^4	6.38×10^6	6.40×10^6	6.39×10^6	96.93
	10	5.00×10^4	5.58×10^6	5.54×10^6	5.56×10^6	84.34
	20	5.00×10^4	3.90×10^6	3.88×10^6	3.89×10^6	59.01
	30	5.00×10^4	3.80×10^5	4.20×10^5	4.00×10^4	0.60
D5.2.3.2**	5	5.00×10^4	6.44×10^6	6.46×10^6	6.45×10^6	97.84
	10	5.00×10^4	6.14×10^6	6.16×10^6	6.15×10^6	93.29
	20	5.00×10^4	4.38×10^6	4.42×10^6	4.40×10^6	66.74
	30	5.00×10^4	3.38×10^6	3.48×10^6	3.43×10^6	52.03
D5.2.3.3	5	5.00×10^4	6.54×10^6	6.52×10^6	6.53×10^6	99.06
	10	5.00×10^4	6.26×10^6	6.26×10^6	6.26×10^6	94.66
	20	5.00×10^4	4.98×10^6	5.10×10^6	5.04×10^6	76.45
	30	5.00×10^4	2.78×10^6	2.70×10^6	2.74×10^6	41.56

หมายเหตุ **สารส่วนที่มีของแข็งผสม

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม D5.2.3.1 D5.2.3.2 และ D5.2.3.3 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสาร D5.2.3.1 และ D5.2.3.3 เท่ากับ 22 และ 27 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สารกลุ่ม D5.2.3.2 มีค่ามากกว่า 30 $\mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 32 นอกจากนี้ในส่วนของ D5.2.3.2 สามารถแยกสาร J ออกมาได้ซึ่งผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับ E ใน สารสกัด hexane



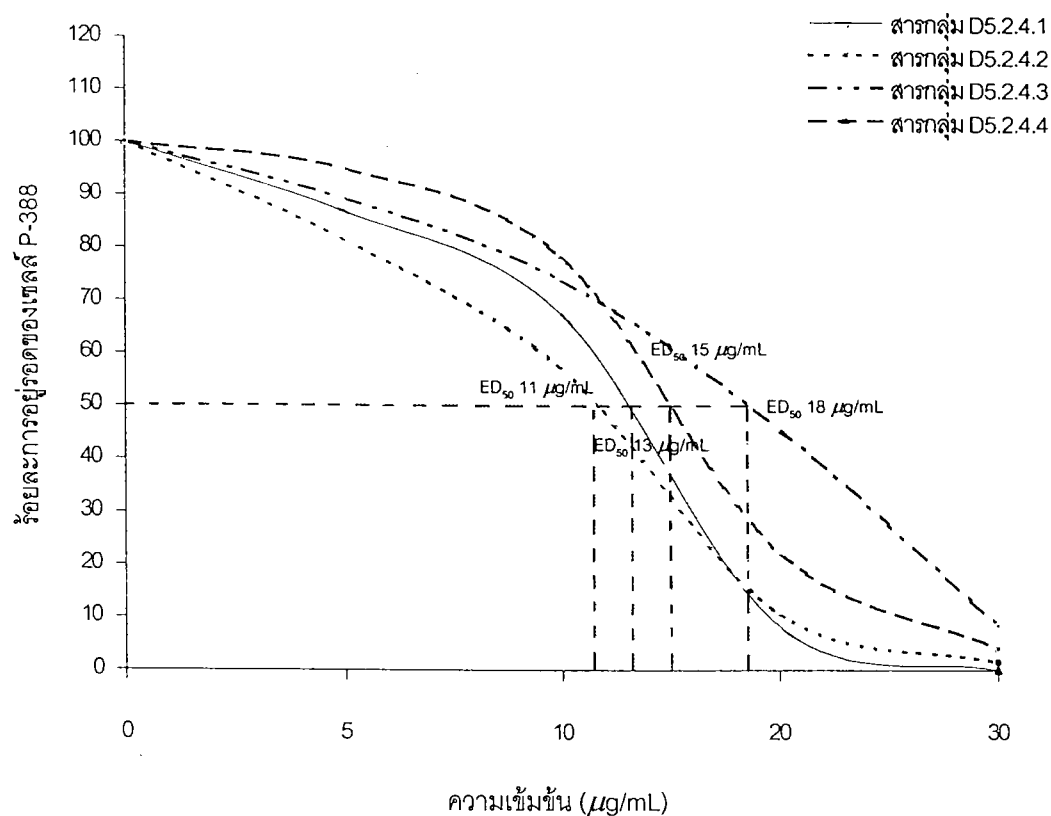
ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.2.3.1 D5.2.3.2 D5.2.3.3

นำสารกลุ่ม D5.2.4.1 D5.2.4.2 D5.2.4.3 และ D5.2.4.4 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม D5.2.4 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 33

ตาราง 33 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก
สารกลุ่ม D5.2.4

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	5.76×10^5	5.78×10^5	5.77×10^5	100.00
D5.2.4.1	5	5.00×10^4	4.72×10^5	4.78×10^5	4.75×10^5	82.31
	10	5.00×10^4	3.86×10^5	3.80×10^5	3.80×10^5	65.85
	20	5.00×10^4	1.80×10^5	2.20×10^5	2.00×10^5	3.46
	30	5.00×10^4	0	0	0	0.00
	5	5.00×10^4	4.58×10^5	4.60×10^5	4.59×10^5	79.54
D5.2.4.2	10	5.00×10^4	3.14×10^5	3.18×10^5	3.16×10^5	54.76
	20	5.00×10^4	6.60×10^5	5.80×10^5	6.20×10^5	10.74
	30	5.00×10^4	8.00×10^4	1.00×10^5	9.00×10^4	1.55
	5	5.00×10^4	5.18×10^5	5.22×10^5	5.20×10^5	90.11
D5.2.4.3	10	5.00×10^4	3.58×10^5	3.50×10^5	3.54×10^5	61.34
	20	5.00×10^4	2.76×10^5	2.70×10^5	2.73×10^5	47.31
	30	5.00×10^4	5.20×10^5	4.60×10^5	4.90×10^5	8.49
	5	5.00×10^4	5.38×10^5	5.36×10^5	5.37×10^5	93.06
D5.2.4.4	10	5.00×10^4	4.34×10^5	4.32×10^5	4.33×10^5	75.03
	20	5.00×10^4	1.30×10^6	1.22×10^6	1.26×10^6	21.83
	30	5.00×10^4	2.60×10^5	2.20×10^5	2.40×10^5	4.15

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม D5.2.4.1 D5.2.4.2 D5.2.4.3 และ D5.2.4.4 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถหาค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสาร D5.2.4.1 D5.2.4.2 D5.2.4.3 และ D5.2.4.4 มีค่าเท่ากับ 13 11 18 และ 15 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 33



ภาพประกอบ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388

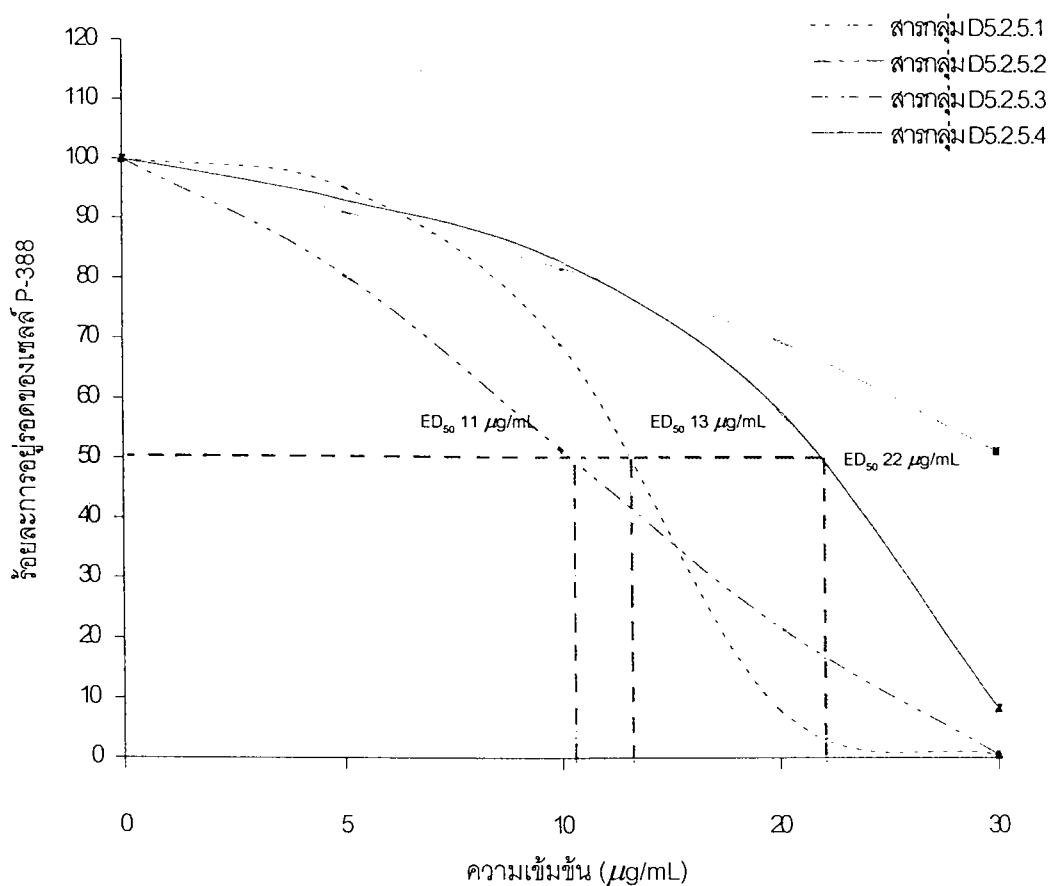
กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.2.4.1 – D5.2.4.4

นำสารกลุ่ม D5.2.5.1 D5.2.5.2 D5.2.5.3 และ D5.2.5.4 ที่แยกได้จาก D5.2.5 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 34

ตาราง 34 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จาก
สารกลุ่ม D5.2.5

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4		ค่าเฉลี่ย	
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	7.22×10^6	7.06×10^6	7.14×10^6	100.00
D5.2.5.1	5	5.00×10^4	6.76×10^6	6.84×10^6	6.80×10^6	95.20
	10	5.00×10^4	4.72×10^6	4.78×10^6	4.75×10^6	66.50
	20	5.00×10^4	3.80×10^5	4.60×10^5	4.20×10^5	5.88
	30	5.00×10^4	4.00×10^4	2.00×10^4	3.00×10^4	0.42
D5.2.5.2	5	5.00×10^4	6.16×10^6	6.24×10^6	6.20×10^6	86.80
	10	5.00×10^4	5.88×10^6	5.80×10^6	5.84×10^6	81.76
	20	5.00×10^4	5.42×10^6	4.52×10^6	4.97×10^6	69.58
	30	5.00×10^4	3.66×10^6	3.64×10^6	3.65×10^6	51.10
D5.2.5.3	5	5.00×10^4	5.94×10^6	5.92×10^6	5.93×10^6	83.02
	10	5.00×10^4	3.70×10^6	3.62×10^6	3.66×10^6	51.24
	20	5.00×10^4	1.76×10^6	1.76×10^6	1.76×10^6	24.64
	30	5.00×10^4	4.00×10^4	4.00×10^4	4.00×10^4	0.56
D5.2.5.4	5	5.00×10^4	6.36×10^6	6.42×10^6	6.39×10^6	89.46
	10	5.00×10^4	5.88×10^6	5.96×10^6	5.92×10^6	82.88
	20	5.00×10^4	3.88×10^6	3.96×10^6	3.92×10^6	54.88
	30	5.00×10^4	5.60×10^5	6.20×10^5	5.90×10^5	8.26

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม D5.2.5.1 D5.2.5.2 D5.2.5.3 และ D5.2.5.4 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสาร D5.2.5.1 D5.2.5.3 และ D5.2.5.4 เท่ากับ 13 11 และ 22 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ส่วนสารกลุ่ม D5.2.5.2 มีค่ามากกว่า 30 $\mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 34



ภาพประกอบ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388 กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.2.5.1 - D5.2.5.4

เนื่องจากสารกลุ่ม D5.2.5.2 มีของแข็งผสมอยู่ ตกผลึกได้สารประกอบ K เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 10 25 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 35 เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าสารประกอบ K มีค่า $\text{ED}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

ตาราง 35 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ K

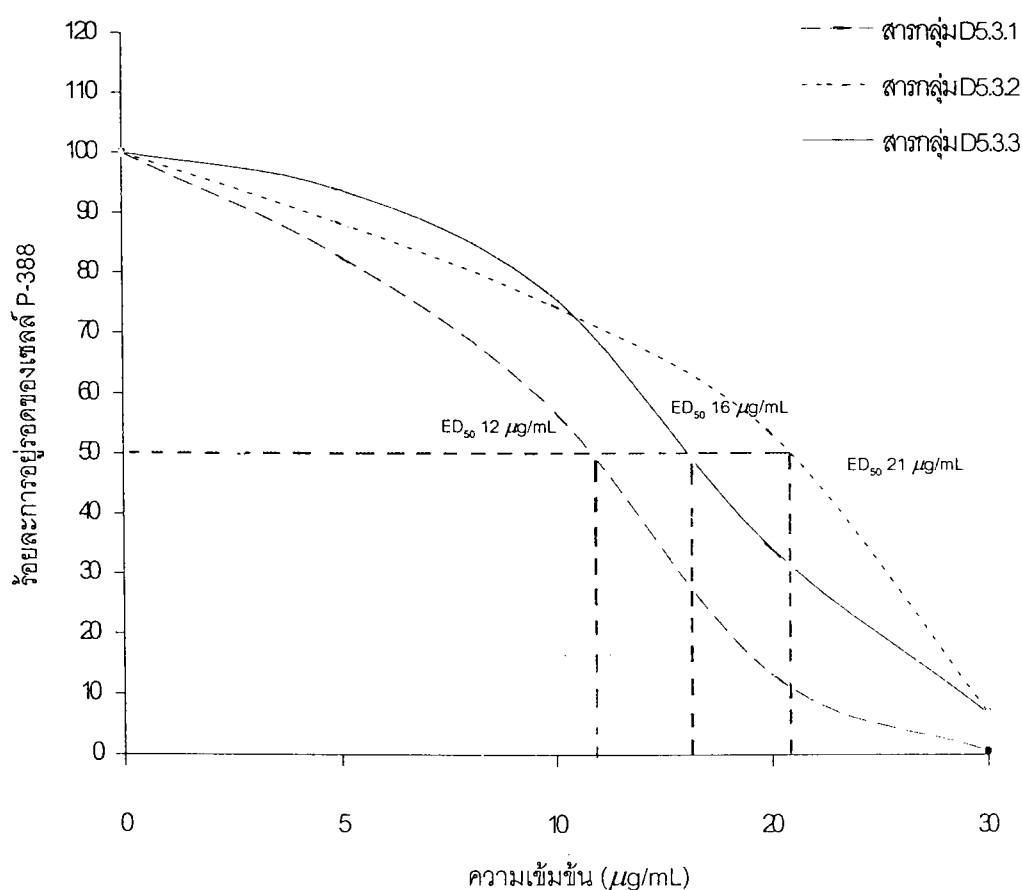
สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย		
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	6.46×10^6	6.40×10^6	6.43×10^6	100.00
สารประกอบ K	10	5.00×10^4	6.30×10^6	6.38×10^6	6.34×10^6	98.58
	25	5.00×10^4	6.18×10^6	6.24×10^6	6.22×10^6	96.72
	50	5.00×10^4	5.42×10^6	5.50×10^6	5.46×10^6	84.90
	100	5.00×10^4	4.36×10^6	4.38×10^6	4.34×10^6	67.48

นำสารกลุ่ม D5.3.1 D5.3.2 และ D5.3.3 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม D5.3 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ผลการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตาราง 36

ตาราง 36 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม D5.3

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ขวด)		ร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์มะเร็ง P-388		
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย		
			ขวด 1	ขวด 2		
กลุ่มควบคุม	0	5.00×10^4	7.76×10^6	7.96×10^6	7.86×10^6	100.00
D5.3.1	5	5.00×10^4	4.86×10^6	5.06×10^6	4.96×10^6	63.09
	10	5.00×10^4	4.20×10^6	4.32×10^6	4.26×10^6	54.18
	20	5.00×10^4	9.20×10^5	9.40×10^5	9.30×10^5	11.82
	30	5.00×10^4	2.00×10^4	6.00×10^4	4.00×10^4	0.50
D5.3.2	5	5.00×10^4	4.92×10^6	5.04×10^6	4.98×10^6	63.34
	10	5.00×10^4	4.42×10^6	4.50×10^6	4.46×10^6	56.73
	20	5.00×10^4	3.94×10^6	4.10×10^6	4.02×10^6	51.13
	30	5.00×10^4	4.40×10^5	6.60×10^5	5.50×10^5	6.99
D5.3.3	5	5.00×10^4	6.94×10^6	6.98×10^6	6.96×10^6	88.53
	10	5.00×10^4	6.04×10^6	6.14×10^6	6.09×10^6	77.46
	20	5.00×10^4	2.24×10^6	2.22×10^6	2.23×10^6	28.36
	30	5.00×10^4	5.80×10^5	5.00×10^5	5.40×10^5	6.86

นำค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม D5.3.1 D5.3.2 และ D5.3.3 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) และจากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถหาค่า ED_{50} (จากกราฟ) ของสาร D5.3.1 D5.3.2 และ D5.3.3 เท่ากับ 12 21 และ 16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 35



ภาพประกอบ 35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง P-388

กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) ของสารกลุ่ม D5.3.1 D5.3.2 D5.3.3

สารกลุ่ม D5.4 เมื่อทดสอบด้วย TLC พบว่ามีองค์ประกอบจำนวนมากที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกกลุ่มสารหลังจากผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และไม่สามารถนำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ต่อไปได้

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์

งานวิจัยนี้สามารถแยกสารในสารสกัดลำต้นหลอดเถื่อนได้สารจำนวน 9 สาร เป็นสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 6 สาร และสารผสมซึ่งมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันมากอีกจำนวน 3 กลุ่ม ดังนี้

จากสารสกัด hexane ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 3 สาร คือ สารประกอบ A C และ F พร้อมกับได้สารผสมอีกจำนวน 3 กลุ่ม คือ สาร B D และ E

จากสารสกัด CH_2Cl_2 ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 3 สาร คือ สารประกอบ G I และ K พร้อมกับได้สารผสมอีกจำนวน 2 กลุ่ม คือ สาร H และ J ซึ่งเหมือนกับสารที่แยกได้ในสารสกัด hexane เมื่อนำมาวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

สารประกอบ A

สารประกอบ A เป็นผลึกสีขาวจุดหลอมเหลว 299-300 °C (จุดหลอมเหลวของ 3 β -O-acetylaleuritolic acid เท่ากับ 301-302 °C Woo & Wagner. 1977 : 1845-1846) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

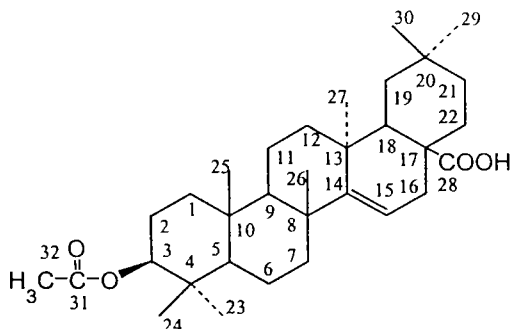
FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ carbonyl ของ ester ที่ 1,733 cm^{-1} และ C-O ที่ 1,242 cm^{-1} และหมู่ carboxyl ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1,687 cm^{-1} (ภาพประกอบ 53)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 7 หมู่ ที่ δ 0.85 – 0.95 ที่ δ 2.04 เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 ที่หมู่ acetoxyl ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ที่ δ 1.00 - 2.40 สัญญาณที่ δ 4.47 มีลักษณะเป็น dd เป็นสัญญาณของ H-3 มีค่า J เท่ากับ 6 Hz และ 10 Hz เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 15 ปรากฏเป็น dd ที่ δ 5.52 มีค่า J เท่ากับ 3.3 Hz และ 7.8 Hz (ตาราง 37 ภาพประกอบ 54)

ตาราง 37 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A

δ_{H} (ppm)	ตำแหน่ง
0.85 – 0.95 m	$\text{CH}_3 \times 7$
1.00 – 2.40 m	$\text{CH}_2 \times 10$ และ $\text{CH} \times 3$
2.04 s	CH_3 ของหมู่ acetoxyl ที่ C-3
4.47 dd $J = 6 \text{ Hz}$ และ 10 Hz	H-3
5.52 dd $J = 3.3 \text{ Hz}$ และ 7.8 Hz	H-15

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี แสดงว่าสารประกอบ A คือ 3β -O-acetylaleuritolic acid
 ดังภาพประกอบ 36 (อนันต์ คงชุม 2544 : 49-54)



ภาพประกอบ 36 สูตรโครงสร้างสารประกอบ A ; 3β -O-acetylaleuritolic acid

สาร B

สาร B เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ $187-190^{\circ}\text{C}$ (จุดหลอมเหลวของ (24R)-5 α -stigmast-3,6-dione เท่ากับ $195-198^{\circ}\text{C}$ Gaspar & Das Neves. 1993 : 523-527)
 ค่า $R_f = 0.45$ (hexane:EtOAc 7:3) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $1,718\text{ cm}^{-1}$ และ $1,708\text{ cm}^{-1}$ เป็นหมู่ carbonyl ของ ketone (ภาพประกอบ 55)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.68-0.94 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ปรากฏที่ δ 1.0 - 2.58 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.95 – 5.17 มีลักษณะเป็น multiplet เป็นของ H-22 และ H-23 (ตาราง 38 ภาพประกอบ 56)

ตาราง 38 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร B

δ_{H} (ppm)	ตำแหน่ง
0.68 – 0.94 m	$\text{CH}_3 \times 6$
1.00 – 2.58 m	$\text{CH}_2 \times 11$ และ $\text{CH} \times 8$
4.95 - 5.17 m	H-22 และ H-23

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 33 พีค เป็นของคาร์บอน 29 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 57) จากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum (ภาพประกอบ 58) สามารถบอกได้ว่าเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกันผสมกัน โดยโครงสร้างหนึ่งมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เนื่องจากมีสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 137.85 และ 129.67 ซึ่งเป็นของ C-22 และ C-23 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-20 และ C-24 ปรากฏที่ downfield โดยมีค่า δ 40.39 และ 51.22 ตามลำดับ (ตาราง 39 และตาราง 40)

ตาราง 39 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร B

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
1 (CH_2)	37.37		37.37
2 (CH_2)	39.36		39.36
3 ($\text{C}=\text{O}$)	209.13		
4 (CH)	36.98	36.98	36.98
5 (CH)	57.50	57.50	57.50
6 ($\text{C}=\text{O}$)	211.28		
7 (CH_2)	46.61		46.61
8 (CH)	38.02	38.02	38.02
9 (CH)	53.46	53.46	53.46
10 (C)	41.24		
11 (CH_2)	21.66		21.66
12 (CH_2)	38.09		38.09
13 (C)	43.00		
14 (CH)	55.99	55.99	55.99
15 (CH_2)	24.00		24.00
16 (CH_2)	28.03		28.03
17 (CH)	56.59	56.59	56.59
18 (CH_3)	12.55		12.55
19 (CH_3)	12.21		12.21

ตาราง 39 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ _c (ppm)	DEPT-90 δ _c (ppm)	DEPT-135 δ _c (ppm)
* 20 (CH)	36.03	36.03	36.03
** 20 (CH)	40.39	40.39	40.39
21 (CH ₃)	18.69		18.69
* 22 (CH ₂)	33.81		38.81
** 22 (CH)	137.85	137.85	137.85
* 23 (CH ₂)	26.03		26.03
** 23 (CH)	129.67	129.67	129.67
* 24 (CH)	45.77	45.77	45.77
** 24 (CH)	51.22	51.22	51.22
25 (CH)	29.11	29.11	29.11
26 (CH ₃)	19.81		19.81
27 (CH ₃)	19.00		19.00
28 (CH ₂)	23.04		23.04
29 (CH ₃)	12.01	12.01	12.01

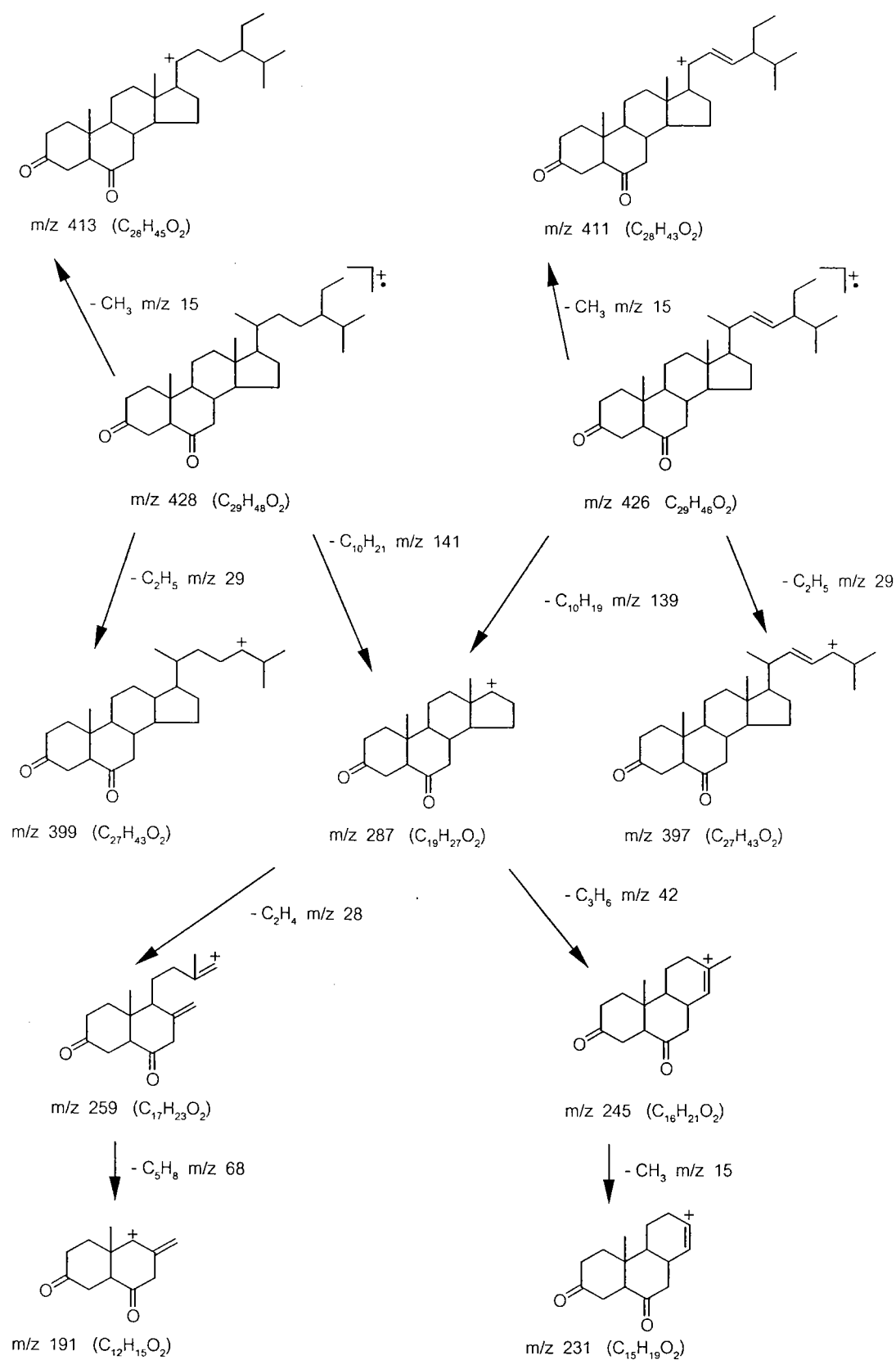
* ตำแหน่ง C-22 และ C-23 เป็น -CH₂-CH₂-

** ตำแหน่ง C-22 และ C-23 เป็น -CH=CH-

ตาราง 40 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B1 และ B2

สารประกอบ B1					สารประกอบ B2				
ตำแหน่ง		^{13}C NMR $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-90 $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-135 $\delta_c(\text{ppm})$	ตำแหน่ง		^{13}C NMR $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-90 $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-135 $\delta_c(\text{ppm})$
1	(CH ₂)	37.37		37.37	1	(CH ₂)	37.37		37.37
2	(CH ₂)	39.36		39.36	1	(CH ₂)	39.36		39.36
3	(C=O)	209.13			3	(C=O)	209.13		
4	(CH)	36.98	36.98	36.98	4	(CH)	36.98	36.98	36.98
5	(CH)	57.50	57.50	57.50	5	(CH)	57.50	57.50	57.50
6	(C=O)	211.28			6	(C=O)	211.28		
7	(CH ₂)	46.61		46.61	7	(CH ₂)	46.61		46.61
8	(CH)	38.02	38.02	38.02	8	(CH)	38.02	38.02	38.02
9	(CH)	53.46	53.46	53.46	9	(CH)	53.46	53.46	53.46
10	(C)	41.24			10	(C)	41.24		
11	(CH ₂)	21.66		21.66	11	(CH ₂)	21.66		21.66
12	(CH ₂)	38.09		38.09	12	(CH ₂)	38.09		38.09
13	(C)	43.00			13	(C)	43.00		
14	(CH)	55.99	55.99	55.99	14	(CH)	55.99	55.99	55.99
15	(CH ₂)	24.00		24.00	15	(CH ₂)	24.00		24.00
16	(CH ₂)	28.03		28.03	16	(CH ₂)	28.03		28.03
17	(CH)	56.59	56.59	56.59	17	(CH)	56.59	56.59	56.59
18	(CH ₃)	12.55		12.55	18	(CH ₃)	12.55		12.55
19	(CH ₃)	12.21		12.21	19	(CH ₃)	12.21		12.21
20	(CH)	36.03	36.03	36.03	20	(CH)	40.39	40.39	40.39
21	(CH ₃)	18.69		18.69	21	(CH ₃)	18.69		18.69
22	(CH ₂)	33.81		33.81	22	(CH)	137.85	137.85	137.85
23	(CH ₂)	26.03		26.03	23	(CH)	129.67	129.67	129.67
24	(CH)	45.77	45.77	45.77	24	(CH)	51.22	51.22	51.22
25	(CH)	29.11	29.11	29.11	25	(CH)	29.11	29.11	29.11
26	(CH ₃)	19.81		19.81	26	(CH ₃)	19.81		19.81
27	(CH ₃)	19.00		19.00	27	(CH ₃)	19.00		19.00
28	(CH ₂)	23.04		23.04	28	(CH ₂)	23.04		23.04
29	(CH ₃)	12.01	12.01	12.01	29	(CH ₃)	12.01	12.01	12.01

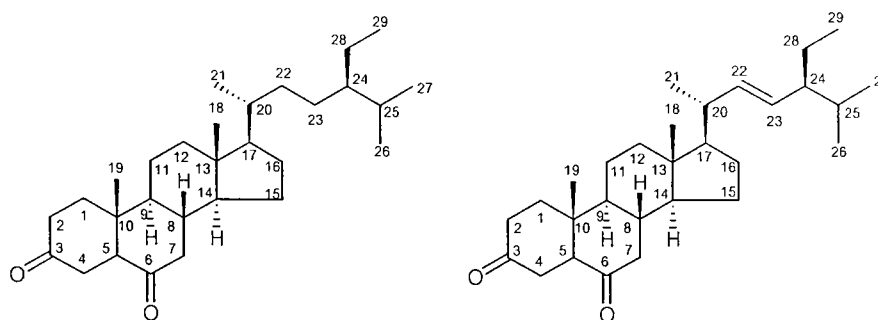
EIMS spectrum (ภาพประกอบ 59) ของสาร B ให้สัญญาณการแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ B1 และ B2 ที่ให้ค่า m/z (% relative intensity) ของ $C_{29}H_{48}O_2$ ที่ 428 $[M_1]^+(66)$ และ ของ $C_{29}H_{46}O_2$ ที่ 426 $[M_2]^+(3)$ สำหรับพีคของไอออนย่อยปรากฏที่ 413 $[M_1-15]^+(8)$ 411 $[M_2-15]^+(3)$ 399 $[M_1-29]^+(10)$ 397 $[M_2-29]^+(1)$ 287 $[M-SC]^+(39)$ 259 $[M-SC-28]^+(18)$ 245 $[M-SC-42]^+(100)$ 231 $[M-SC-42-15]^+(16)$ และ 191 $[M-SC-28-68]^+(5)$ แสดงในภาพประกอบ 37



ภาพประกอบ 37 การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ B1 และ B2

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีสรุปได้ว่าสาร B เป็นสารผสมระหว่าง stigmasteran-3,6-dione และ stigmasteran-22-en-3,6-dione เนื่องจากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum มีสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 137.85 และ 129.67 ซึ่งเป็นของ C-22 และ C-23 ที่มีพันธะคู่ระหว่าง C-22 กับ C-23 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-20 และ C-24 ปรากฏ downfield ที่ δ 40.39 และ 51.22 ตามลำดับ ซึ่งสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏที่ δ 40.39 137.85 129.67 และ 51.22 กำหนดได้ว่าเป็นของ stigmasteran-22-en-3,6-dione ที่ตำแหน่ง C-20 C-22 C-23 และ C-24 ตามลำดับ ซึ่งสัญญาณเรโซแนนซ์ดังกล่าวจะปรากฏ downfield กว่าของ stigmasteran-3,6-dione ซึ่งไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 และจากค่า ^1H NMR ที่ δ 4.95 – 5.17 เป็นส่วนของ olefinic protons ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 ของ stigmasteran-22-en-3,6-dione และจากข้อมูล EIMS spectrum ให้พิกัดที่ m/z 428 เป็น molecular ion ของ stigmasteran-3,6-dione และ 426 เป็น molecular ion ของ stigmasteran-22-en-3,6-dione ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ stigmasteran-3,6-dione (Greca, Monaco & Previtera. 1990 : 1430-1435) (24R)-5 α -stigmasteran-3,6-dione และ stigmasteran-22-en-3,6-dione (Gaspar & Neves. 1993 : 523-527)

สูตรโครงสร้างของ stigmasteran-3,6-dione และ stigmasteran-22-en-3,6-dione แสดงในภาพประกอบ 38



ภาพประกอบ 38 สูตรโครงสร้างสารประกอบ B1 และ B2 ; stigmasteran-3,6-dione และ stigmasteran-22-en-3,6-dione

สารประกอบ C

สาร C เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 266-268 °C ค่า $R_f = 0.31$ (hexane:EtOAc 7:3) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $3,481\text{ cm}^{-1}$ เป็นหมู่ OH และ $1,770\text{ cm}^{-1}$ เป็นหมู่ carbonyl ของ γ -lactone ส่วนที่ $1,707\text{ cm}^{-1}$ เป็นหมู่ carbonyl ของ ester (ภาพประกอบ 60)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 7 หมู่ ที่ δ 0.84-1.22 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.03 เป็นของ $-\text{OCH}_3$ สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ปรากฏที่ δ 1.14-1.97 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.24 มีลักษณะเป็น triplet (t) มีค่า J เท่ากับ 8.19 Hz เป็นของ H-16 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.46 มีลักษณะเป็น triplet (t) มีค่า J เท่ากับ 7.87 Hz เป็นของ H-3 (ตาราง 41 และภาพประกอบ 61)

ตาราง 41 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร C

δ_{H} (ppm)		ตำแหน่ง
0.84 – 1.22	m	$\text{CH}_3 \times 7$
1.14 - 1.97	m	$\text{CH}_2 \times 10$ และ $\text{CH} \times 4$
2.03	s	$-\text{OCH}_3$
4.24	t $J = 8.1\text{ Hz}$	H-16
4.46	t $J = 7.8\text{ Hz}$	H-3

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 32 พีค เป็นของคาร์บอน 32 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 62) จากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum (ภาพประกอบ 63) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 5 หมู่ ที่ δ 50.43 (C-18) 50.52 (C-9) 54.58 (C-5) 67.75 (C-16) และ 80.65 (C-3) สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 3 หมู่ ที่ δ 37.41 (C-11) 38.43 (C-10) และ 64.55 (C-3) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 10 หมู่ ที่ δ 17.78 (C-6) 18.09 (C-11) 23.60 (C-2) 26.62 (C-12) 31.22 (C-15) 32.07 (C-22) 33.88 (C-21) 36.90 (C-7) 37.21 (C-19) และ 38.70 (C-1) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_3 8 หมู่ ที่ δ 13.95 (C-26) 16.03 (C-25) 16.39 (C-24) 18.90 (C-27) 23.87 (C-30) 27.84 (C-23) 33.18 (C-29) และ 21.32 ($-\text{OOCCH}_3$) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ที่ δ 31.43 (C-20) 36.90

(C-10) 37.70 (C-4) 43.01 (C-8) 43.56 (C-14) 47.29 (C-17) 93.27 (C-13) 179.31 (C-28)
และ 171.10 (-OOCCH₃) ตามลำดับ (ตาราง 42)

ตาราง 42 ข้อมูล ¹³C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ C

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ _c (ppm)	DEPT-90 δ _c (ppm)	DEPT-135 δ _c (ppm)
1 (CH ₂)	38.70		38.70
2 (CH ₂)	23.60		23.60
3 (CH)	80.65	80.65	80.65
4 (C)	37.70		
5 (CH)	54.58	54.58	54.58
6 (CH ₂)	17.78		17.78
7 (CH ₂)	36.90		36.90
8 (C)	43.01		
9 (CH)	50.52	50.52	50.52
10 (C)	36.90		
11 (CH ₂)	18.09		18.09
12 (CH ₂)	26.62		26.62
13 (C)	93.27		
14 (C)	43.56		
15 (CH ₂)	31.22		31.22
16 (CH)	67.75	67.75	67.75
17 (C)	47.29		
18 (CH)	50.43	50.43	50.43
19 (CH ₂)	37.21		37.21
20 (C)	31.43		
21 (CH ₂)	33.88		33.88
22 (CH ₂)	32.07		32.07
23 (CH ₃)	27.84		27.84
24 (CH ₃)	16.39		16.39
25 (CH ₃)	16.03		16.03

ตาราง 42 (ต่อ)

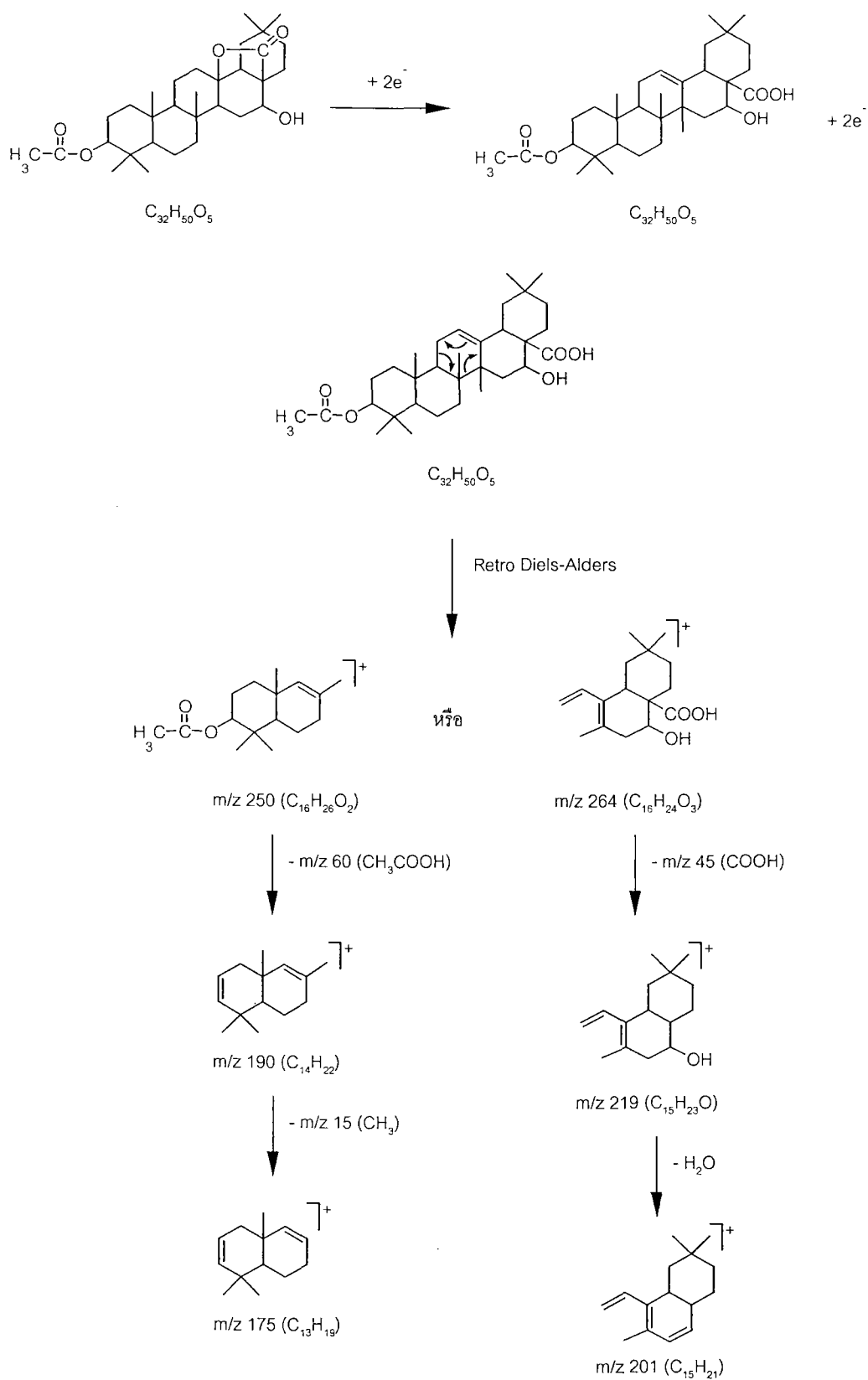
ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
26 (CH_3)	13.95		13.95
27 (CH_3)	18.90		18.90
28 ($\text{C}=\text{O}$)	179.31		
29 (CH_3)	33.18		33.18
30 (CH_3)	23.87		23.87
-OO $^{13}\text{CCH}_3$	171.10		
-OOC $^{13}\text{CH}_3$	21.32		21.32

HMQC spectrum (ภาพประกอบ 64) แสดงถึงโปรตอนที่สร้างพันธะกับคาร์บอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล แสดงดังข้อมูล (ตาราง 43)

ตาราง 43 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ C

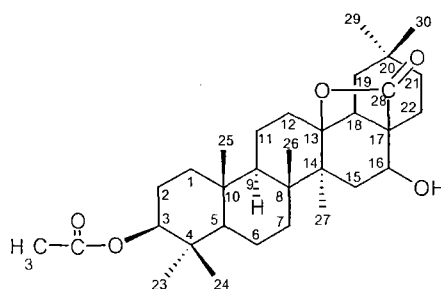
δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
67.75 (C-16)	4.24 (H-16)	CH-16
80.65 (C-3)	4.46 (H-3)	CH-3
21.32 ($\text{CH}_3\text{COO}-$)	2.03 ($\text{CH}_3\text{COO}-$)	($\text{CH}_3\text{COO}-$)

EIMS spectrum ของสารประกอบ C (ภาพประกอบ 65) ให้สัญญาณการแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ C ที่ให้ค่า m/z (% relative intensity) พิกของไอออนปรากฏที่ 264 $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3]^+$ (17) 250 $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2]^+$ (15) 219 $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}]^+$ (6) 201 $[\text{C}_{15}\text{H}_{21}]^+$ (1) 190 $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}]^+$ (4) และ 175 $[\text{C}_{13}\text{H}_{19}]^+$ (2) แสดงในภาพประกอบ 39



ภาพประกอบ 39 การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ C

จากสเปกโตรสโคปีพบว่าข้อมูลของสารประกอบ C ^{13}C และ DEPT spectrum มีสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 67.75 ซึ่งเป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง C-16 และจากค่า ^1H NMR ที่ δ 4.24 เป็นส่วนของโปรตอนที่มี H-16 ซึ่งจะต่างจากในโมเลกุลของ 3 β -acetoxyolean-28,13-olide (Katai, Tarai & Meguri. 1983 : 1567-1571) และ 3 β -acetyl oleanan-28,13 β -olide (Al-hazimi, Miana & Deep. 1987 : 1091-1093) จากข้อมูลดังกล่าวสามารถกำหนดได้ว่า ที่ตำแหน่ง 16 มีหมู่ hydroxy และจากข้อมูล EIMS spectrum ในโมเลกุลของสารประกอบมีการแตกพันธะแบบ retro Diels-Alders ให้พีคของไอออนที่ m/z 250 $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2]^+$ และ 264 $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3]^+$ ซึ่งคล้ายกับลักษณะการแตกพันธะแบบ retro Diels-Alders ของสารประกอบ 1 β ,3 β -dihydroxy-urs-12-ene-28-oic acid และ 3 β ,28-dihydroxy-12-ursene (Siddiqui, *et al.* 1986 : 1086-1090) จากการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารประกอบประเภทซาโปนินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันกับโครงสร้างสารที่แยกได้นี้จะมีหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่ง C-16 พบในงานวิจัยของ ซอง และคณะ (Song, *et al.* 2001 : 491-497) โซว และคณะ (Seo, *et al.* 2002 : 170-174) โกว และคณะ (Guo, *et al.* 2000 : 861-868) และ ชาง และคณะ (Zhang, *et al.* 1999 : 715-722) และสารประกอบ 3 β ,16 α -dihydroxyoleanan-28,13-olide (Pradhan, Chakraborty & Subba. 1990 : 1693-1695) จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ C มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$ ซึ่งสารประกอบนี้ไม่พบว่ามีรายงานการค้นพบมาก่อน จากข้อมูลและโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ C สามารถเรียกชื่อได้ว่า 3 β -acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide ซึ่งเทียบการอ่านชื่อกับสารประกอบโครงสร้างโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันที่มี -OH ที่ตำแหน่ง C-12 อ่านเป็น 3 β -acetoxy-12-hydroxyoleanan-28,13-olide สารนี้แยกได้จากสารสกัดส่วนใบและลำต้นของ *Rhodomirtus tomentosa* ฮุย และลี่ (Hui & Li. 1976 : 1741-1743) และมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 40



ภาพประกอบ 40 สูตรโครงสร้างสารประกอบ C ; 3 β -acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide

สาร D

สาร D เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 201-205 °C (จุดหลอมเหลว stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one เท่ากับ 210 – 213 °C และ stigmas-4-en-6 β -ol-3-one เท่ากับ 211 – 213 °C Katsui, et al. 1972 : 223-226) ค่า R_f = 0.50 (hexane:EtOAc 1:1) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3,489 cm^{-1} เป็นหมู่ OH และ 1,689 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ของ ketone (ภาพประกอบ 66)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.73-1.30 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ปรากฏที่ δ 0.94-2.57 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.34 มีลักษณะเป็น broad singlet (br s) เป็นของ H-6 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.96 – 5.17 มีลักษณะเป็น multiplet (m) เป็นของ H-22 และ H-23 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.80 มีลักษณะเป็น singlet (s) เป็นของ H-4 (ตาราง 44 ภาพประกอบ 67)

ตาราง 44 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร D

δ_{H} (ppm)			ตำแหน่ง
0.73 – 1.30	m	$\text{CH}_3 \times 6$	
0.94 - 2.57	m	$\text{CH}_2 \times 10$ และ $\text{CH} \times 7$	
4.34	br s	H-6	
4.96 – 5.17	m	H-22 และ H-23	
5.80	s	H-4	

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 33 พีค เป็นของคาร์บอน 29 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 68) จากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum (ภาพประกอบ 69) สามารถบอกได้ว่า เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกันผสมกัน โดยโครงสร้างหนึ่งมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เนื่องจากบางสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 138.11 และ 129.46 ซึ่งเป็นของ C-22 และ C-23 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-20 และ C-24 ปรากฏที่ downfield โดยมีค่า δ 40.47 และ 51.23 ตามลำดับ (ตาราง 45 และตาราง 46)

ตาราง 45 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร D

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
1 (CH ₂)	38.54		38.54
2 (CH ₂)	34.25		34.25
3 (C=O)	200.46		
4 (CH)	126.30	126.30	126.30
5 (C)	168.53		
6 (CH)	73.25	73.25	73.25
7 (CH ₂)	37.08		37.08
8 (CH)	29.71	29.71	29.71
9 (CH)	53.61	53.61	53.61
10 (C)	37.98		
11 (CH ₂)	20.96		20.96
12 (CH ₂)	39.58		39.58
13 (C)	42.49		
14 (CH)	56.04	56.04	56.04
15 (CH ₂)	24.14		24.14
16 (CH ₂)	28.17		28.17
17 (CH)	55.87	55.87	55.87
18 (CH ₃)	12.00		12.00
19 (CH ₃)	19.81		19.81
* 20 (CH)	36.10	36.10	36.10
** 20 (CH)	40.47	40.47	40.47
21 (CH ₃)	18.72		18.72
* 22 (CH ₂)	33.88		33.88
** 22 (CH)	138.11	138.11	138.11
* 23 (CH ₂)	26.06		26.06
** 23 (CH)	129.46	129.46	129.46

ตาราง 45 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ _c (ppm)	DEPT-90 δ _c (ppm)	DEPT-135 δ _c (ppm)
* 24 (CH)	45.81	45.81	45.81
** 24 (CH)	51.23	51.23	51.23
25 (CH)	29.15	29.15	29.15
26 (CH ₃)	19.01		19.01
27 (CH ₃)	19.49		19.49
28 (CH ₂)	23.05		23.05
29 (CH ₃)	12.23		12.23

* ตำแหน่ง C-22 และ C-23 เป็น -CH₂-CH₂-

** ตำแหน่ง C-22 และ C-23 เป็น -CH=CH-

ตาราง 46 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ D1 และ D2

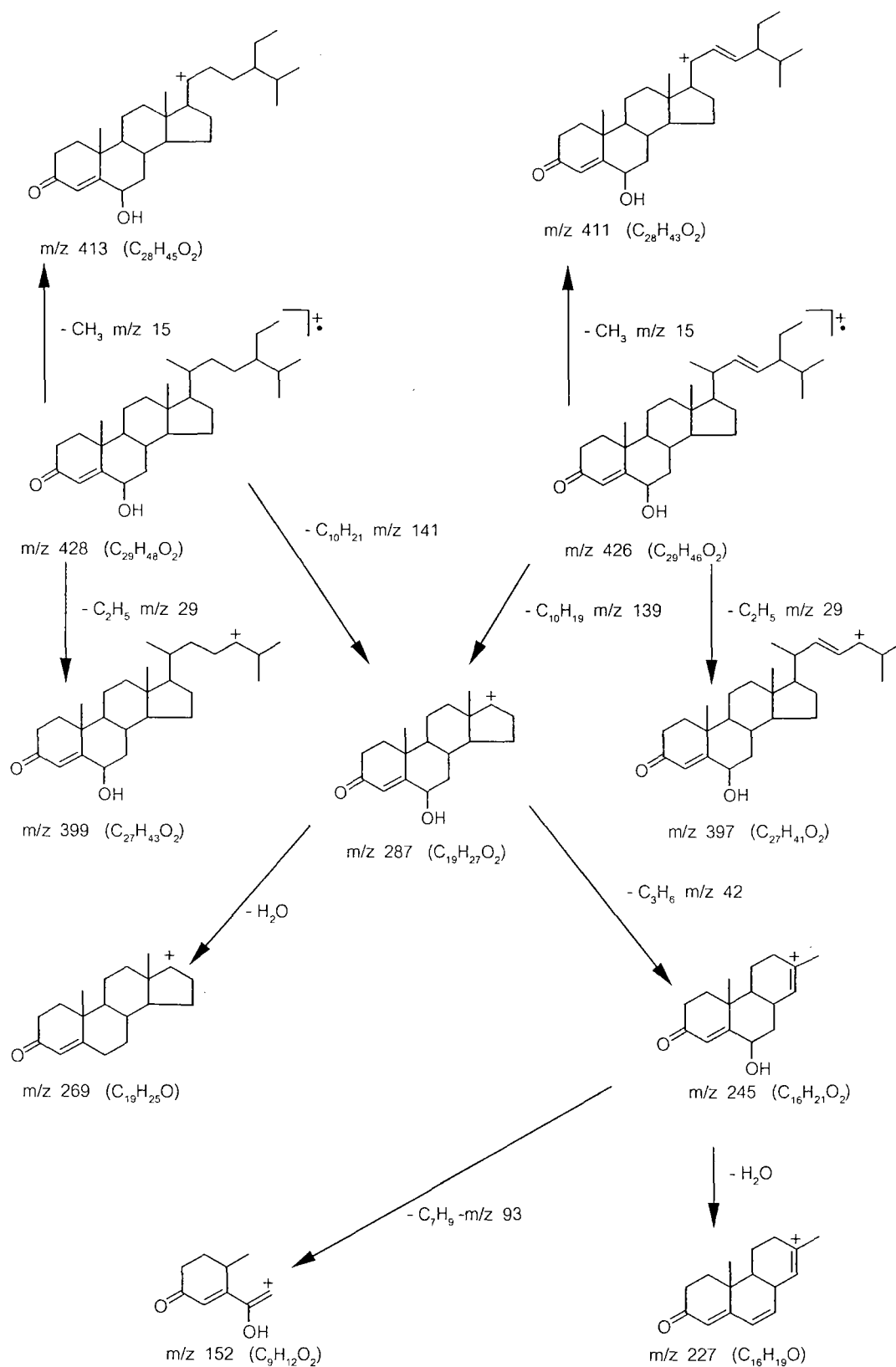
สารประกอบ D1				สารประกอบ D2			
ตำแหน่ง	^{13}C NMR $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-90 $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-135 $\delta_c(\text{ppm})$	ตำแหน่ง	^{13}C NMR $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-90 $\delta_c(\text{ppm})$	DEPT-135 $\delta_c(\text{ppm})$
1	(CH ₂) 38.54		38.54	1	(CH ₂) 38.54		38.54
2	(CH ₂) 34.25		34.25	2	(CH ₂) 34.25		34.25
3	(C=O) 200.46			3	(C=O) 200.46		
4	(CH) 126.30	126.30	126.30	4	(CH) 126.30	126.30	126.30
5	(C) 168.53			5	(C) 168.53		
6	(CH) 73.25	73.25	73.25	6	(CH) 73.25	73.25	73.25
7	(CH ₂) 37.08		37.08	7	(CH ₂) 37.08		37.08
8	(CH) 29.71	29.71	29.71	8	(CH) 29.71	29.71	29.71
9	(CH) 53.61	53.61	53.61	9	(CH) 53.61	53.61	53.61
10	(C) 37.98			10	(C) 37.98		
11	(CH ₂) 20.96		20.96	11	(CH ₂) 20.96		20.96
12	(CH ₂) 39.58		39.58	12	(CH ₂) 39.58		39.58
13	(C) 42.49			13	(C) 42.49		
14	(CH) 56.04	56.04	56.04	14	(CH) 56.04	56.04	56.04
15	(CH ₂) 24.14		24.14	15	(CH ₂) 24.14		24.14
16	(CH ₂) 28.17		28.17	16	(CH ₂) 28.17		28.17
17	(CH) 55.87	55.87	55.87	17	(CH) 55.87	55.87	55.87
18	(CH ₃) 12.00		12.00	18	(CH ₃) 12.00		12.00
19	(CH ₃) 19.81		19.81	19	(CH ₃) 19.81		19.81
20	(CH) 36.10	36.10	36.10	20	(CH) 40.47	40.47	40.47
21	(CH ₃) 18.72		18.72	21	(CH ₃) 18.72		18.72
22	(CH ₂) 33.88		33.88	22	(CH) 138.11	138.11	138.11
23	(CH ₂) 26.06		26.06	23	(CH) 129.46	129.46	129.46
24	(CH) 45.81	45.81	45.81	24	(CH) 51.23	51.23	51.23
25	(CH) 29.15	29.15	29.15	25	(CH) 29.15	29.15	29.15
26	(CH ₃) 19.01		19.01	26	(CH ₃) 19.01		19.01
27	(CH ₃) 19.49		19.49	27	(CH ₃) 19.49		19.49
28	(CH ₂) 23.05		23.05	28	(CH ₂) 23.05		23.05
29	(CH ₃) 12.23	12.23	12.23	29	(CH ₃) 12.23	12.23	12.23

HMQC spectrum (ภาพประกอบ 70) แสดงถึงโปรตอนที่สร้างพันธะกับคาร์บอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล แสดงดังข้อมูล (ตาราง 47)

ตาราง 47 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ D

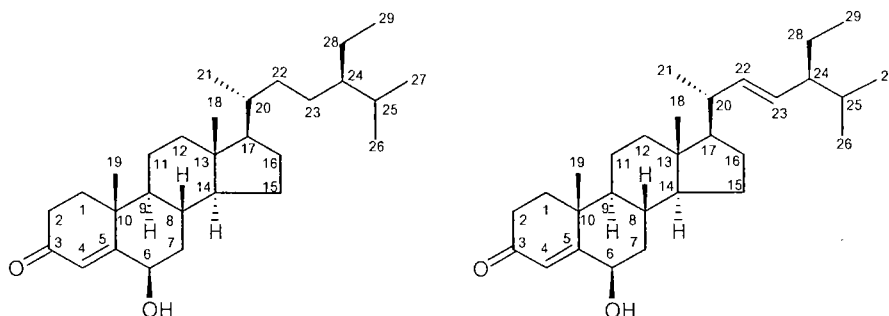
δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
73.25 (C-6)	4.34	CH-6
126.30 (C-4)	5.80	CH-4

EIMS spectrum ของสาร D (ภาพประกอบ 71) ให้สัญญาณการแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ D1 และ D2 ที่ให้ค่า m/z (% relative intensity) ของ $C_{29}H_{48}O_2$ ที่ 428 $[M_1]^+$ (100) และ ของ $C_{29}H_{46}O_2$ ที่ 426 $[M_2]^+$ (2) สำหรับพีคของไอออนย่อยปรากฏที่ 413 $[M_1-15]^+$ (20) 411 $[M_2-15]^+$ (3) 399 $[M_1-29]^+$ (9) 397 $[M_2-29]^+$ (1) 287 $[M-SC]^+$ (17) 269 $[M-SC-H_2O]^+$ (14) 245 $[M-SC-42]^+$ (39) 227 $[M-SC-42-H_2O]^+$ (35) และ 191 $[M-SC-42-93]^+$ (65) แสดงในภาพประกอบ 41



ภาพประกอบ 41 การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ D1 และ D2

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีสรุปได้ว่าสาร D เป็นสารผสมระหว่าง stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one เนื่องจากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum มีสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 138.11 และ 129.46 ซึ่งเป็นของ C-22 และ C-23 ที่มีพันธะคู่ระหว่าง C-22 กับ C-23 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-20 และ C-24 ปรากฏ downfield ที่ δ 40.47 51.23 ตามลำดับ ซึ่งสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏที่ δ 40.47 138.11 129.46 และ 51.23 กำหนดได้ว่าเป็นของ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one ที่ตำแหน่ง C-20 C-22 C-23 และ C-24 ตามลำดับซึ่งสัญญาณเรโซแนนซ์ดังกล่าวจะปรากฏ downfield กว่าของ stigmast-4-en-6 β -ol-3-one ซึ่งไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 และจากค่า ^1H NMR ที่ δ 4.96 – 5.17 เป็นส่วนของ olefinic protons ที่ H-22 และ H-23 เป็นของ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one และข้อมูล EIMS spectrum ให้พีคที่ m/z 428 เป็น molecular ion ของ stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ 426 เป็น molecular ion ของ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ stigmast-4-en-6 β -ol-3-one (Greca, Monaco & Previtera. 1990 : 1430-1435) stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one (Katsui, *et al.* 1972 : 223-226) สูตรโครงสร้างสารประกอบ stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one แสดงในภาพประกอบ 42



ภาพประกอบ 42 สูตรโครงสร้างสารประกอบ D1 และ D2 ; stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one

สาร E

สาร E เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 136-140 °C (จุดหลอมเหลว 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one เท่ากับ 140-141 °C Das & Srinivas. 1992 : 2427-2429 และของ 7-oxo-5,6-dihydrostigmast-5-en-7-one เท่ากับ 149 °C Jones, *et al.* 1998 : 3786-3789) ค่า R_f = 0.35 (hexane:EtOAc 1:1) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3,422 cm^{-1} เป็นหมู่ OH ที่ 1,701 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ของ ketone และที่ 1,670 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ซึ่งเป็นของ α,β -unsaturated ketone (ภาพประกอบ 72)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.66-1.18 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ปรากฏที่ δ 1.00-2.51 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.05-3.78 มีลักษณะเป็น multiple (m) เป็นของ H-3 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.95 – 5.21 มีลักษณะเป็น multiplet (m) เป็นของ H-22 และ H-23 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.67 มีลักษณะเป็น singlet (s) เป็นของ H-6 (ตาราง 48 ภาพประกอบ 73)

ตาราง 48 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร E

δ_{H} (ppm)		ตำแหน่ง
0.66 -1.18	m	$\text{CH}_3 \times 6$
1.00 - 2.51	m	$\text{CH}_2 \times 10$ และ $\text{CH} \times 7$
3.05 - 3.78	m	H-3
4.95 – 5.21	m	H-22 และ H-23
5.67	s	H-6

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ (ภาพประกอบ 74) จากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum (ภาพประกอบ 75) สามารถบอกได้ว่า เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกันผสมกัน โดยโครงสร้างหนึ่งมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เนื่องจากบางสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 137.98 และ 129.49 ซึ่งเป็นของ C-22 และ C-23 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-20 และ C-24 ปรากฏที่ downfield โดยมีค่า δ 40.25 และ 51.22 ตามลำดับ และมีสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏที่ downfield โดยมีค่า δ 210.95 ซึ่งเป็น

สัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ของหมู่ carbonyl ของ ketone ในโครงสร้างโมเลกุล และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-6 ปรากฏที่ δ 46.74 (ตาราง 49 และตาราง 50)

ตาราง 49 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสาร E

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
1 (CH ₂)	36.67		36.67
2 (CH ₂)	31.19		31.19
3 (CH)	70.53	70.53	70.53
4 (CH ₂)	41.81		41.81
5 ^{**} (C)	165.08		
5 [*] (CH)	53.95	53.95	53.95
6 ^{**} (CH)	126.12	126.12	126.12
6 [*] (CH ₂)	46.74		46.74
7 ^{**} (C=O)	202.34		
7 [*] (C=O)	210.95		
8 (CH)	45.41	45.41	45.41
9 (CH)	49.94	49.94	49.94
10 (C)	38.28		
11 (CH ₂)	21.21		21.21
12 (CH ₂)	39.52		39.52
13 (C)	42.99		
14 (CH)	49.94	49.94	49.94
15 (CH ₂)	26.33		26.33
16 (CH ₂)	28.56		28.56
17 (CH)	54.70	54.70	54.70
18 (CH ₃)	11.97		11.97
19 (CH ₃)	17.31		17.31

ตาราง 49 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
20 [*] (CH)	36.08	36.08	36.08
20 ^{**} (CH)	40.25	40.25	40.25
21 (CH ₃)	18.93		18.93
22 [*] (CH ₂)	33.94		33.94
22 ^{**} (CH)	137.98	137.98	137.98
23 [*] (CH ₂)	26.07		26.07
23 ^{**} (CH)	129.49	129.49	129.49
24 [*] (CH)	45.81	45.81	45.81
24 ^{**} (CH)	51.22	51.22	51.22
25 (CH)	29.13	29.13	29.13
26 (CH ₃)	19.80		19.80
27 (CH ₃)	19.01		19.01
28 (CH ₂)	23.05		23.05
29 (CH ₃)	11.97		11.97

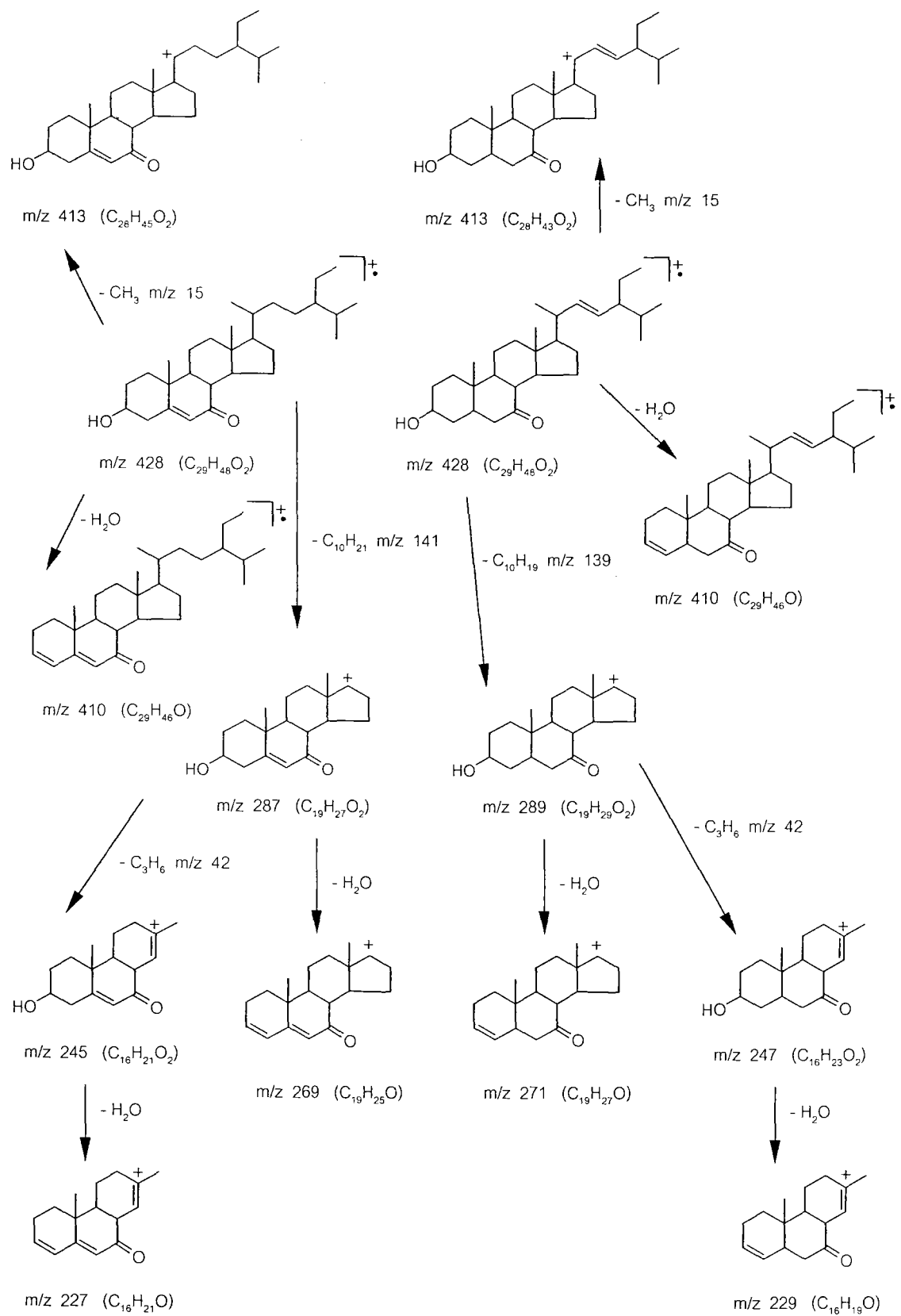
* ตำแหน่ง C ระหว่าง 5 กับ 6 และ 22 กับ 23 เป็นพันธะเดี่ยว

** ตำแหน่ง C ระหว่าง 5 กับ 6 และ 22 กับ 23 เป็นพันธะคู่

ตาราง 50 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ E1 และ E2

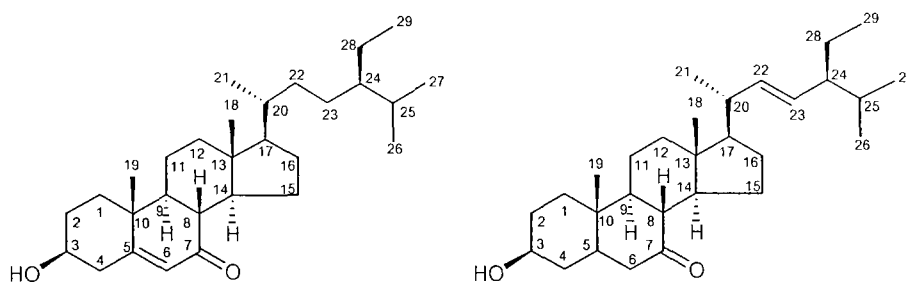
สารประกอบ E1				สารประกอบ E2			
ตำแหน่ง	^{13}C NMR	DEPT-90	DEPT-135	ตำแหน่ง	^{13}C NMR	DEPT-90	DEPT-135
	$\delta_c(\text{ppm})$	$\delta_c(\text{ppm})$	$\delta_c(\text{ppm})$		$\delta_c(\text{ppm})$	$\delta_c(\text{ppm})$	$\delta_c(\text{ppm})$
1	(CH ₂) 36.67		36.67	1	(CH ₂) 36.67		36.67
2	(CH ₂) 31.19		31.19	2	(CH ₂) 31.19		31.19
3	(CH) 70.72	70.72	70.72	3	(CH) 70.52	70.52	70.52
4	(CH ₂) 41.81		41.81	4	(CH) 41.81		41.81
5	(C) 165.08			5	(CH) 53.95	53.95	53.95
6	(CH) 126.12	126.12	126.12	6	(CH) 46.74	46.74	46.74
7	(C=O) 202.34			7	(C=O) 210.95		
8	(CH) 45.41	45.41	45.41	8	(CH) 45.41	45.41	45.41
9	(CH) 49.94	49.94	49.94	9	(CH) 49.94	49.94	49.94
10	(C) 38.28			10	(C) 38.28		
11	(CH ₂) 21.21		21.21	11	(CH ₂) 21.21		21.21
12	(CH ₂) 39.52		39.52	12	(CH ₂) 39.52		39.52
13	(C) 42.99			13	(C) 42.99		
14	(CH) 49.94	49.94	49.94	14	(CH) 49.94	49.94	49.94
15	(CH ₂) 26.33		26.33	15	(CH ₂) 26.33		26.33
16	(CH ₂) 28.56		28.56	16	(CH ₂) 28.56		28.56
17	(CH) 54.70	54.70	54.70	17	(CH) 54.70	54.70	54.70
18	(CH ₃) 11.97		11.97	18	(CH ₃) 11.97		11.97
19	(CH ₃) 17.31		17.31	19	(CH ₃) 17.31		17.31
20	(CH) 36.08	36.08	36.08	20	(CH) 40.25	40.25	40.25
21	(CH ₃) 18.93		18.93	21	(CH ₃) 18.93		18.93
22	(CH ₂) 33.94		33.94	22	(CH) 137.98	137.98	137.98
23	(CH ₂) 26.07		26.07	23	(CH) 129.49	129.49	129.49
24	(CH) 45.81	45.81	45.81	24	(CH) 51.22	51.22	51.22
25	(CH) 29.13	29.13	29.13	25	(CH) 29.13	29.13	29.13
26	(CH ₃) 19.80		19.80	26	(CH ₃) 19.80		19.80
27	(CH ₃) 19.01		19.01	27	(CH ₃) 19.01		19.01
28	(CH ₂) 23.05		23.05	28	(CH ₂) 23.05		23.05
29	(CH ₃) 11.97	11.97	11.97	29	(CH ₃) 11.97	11.97	11.97

EIMS spectrum ของสาร E (ภาพประกอบ 76) ให้สัญญาณการแตกตัวเป็นไอออนของ สารประกอบ E1 และ E2 ที่ให้ค่า m/z (% relative intensity) ของ $C_{29}H_{48}O_2$ ที่ 428 $[M]^+(74)$ สำหรับพีคของไอออนย่อยปรากฏที่ 413 $[M-15]^+(6)$ 410 $[M-H_2O]^+(26)$ 289 $[M_2-SC]^+(38)$ 287 $[M_1-SC]^+(55)$ 271 $[M_2-SC-H_2O]^+(22)$ 269 $[M_1-SC-H_2O]^+(28)$ 247 $[M_2-SC-42]^+(81)$ 245 $[M_1-SC-42]^+(17)$ 229 $[M_2-SC-42-H_2O]^+(34)$ และ 227 $[M_1-SC-42-H_2O]^+(21)$ แสดงใน ภาพประกอบ 43



ภาพประกอบ 43 การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ E1 และ E2

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีสรุปได้ว่าสาร E เป็นสารผสมระหว่าง 3β -hydroxy stigmaster-5-en-7-one และ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol เนื่องจากข้อมูล ^{13}C และ DEPT spectrum มีสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 210.95 ซึ่งเป็นของ saturated ketone ที่ตำแหน่ง C-7 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-6 ปรากฏที่ δ 46.74 และมีสัญญาณเรโซแนนซ์ปรากฏที่ δ 137.98 และ 129.49 ซึ่งเป็นของ C-22 และ C-23 ที่มีพันธะคู่ระหว่าง C-22 กับ C-23 และมีผลทำให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-20 และ C-24 ปรากฏ downfield ที่ δ 40.25 และ 51.22 ตามลำดับ ซึ่งสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏที่ δ 46.74 210.95 40.25 137.98 129.49 และ 51.22 กำหนดได้ว่าเป็นของ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol ที่ตำแหน่ง C-6 C-7 C-20 C-22 C-23 และ C-24 ตามลำดับของ ซึ่งสัญญาณเรโซแนนซ์ C-7 C-20 C-22 C-23 และ C-24 จะปรากฏ downfield กว่าของ 3β -hydroxystigmaster-5-en-7-one ซึ่งไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-6 จะปรากฏ upfield กว่าของ 3β -hydroxystigmaster-5-en-7-one เนื่องจากไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 5 และ 6 ในโมเลกุล และจากค่า ^1H NMR ที่ δ 4.95 – 5.21 เป็นส่วนของ olefinic protons ที่ H-22 และ H-23 เป็นของ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol ที่ δ 5.67 เป็นส่วนของโปรตอน ที่ H-6 เป็นของ 3β -hydroxystigmaster-5-en-7-one และข้อมูล EIMS spectrum ให้พิกที่ m/z 428 เป็น molecular ion ของ $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ และปรากฏพิกของไอออนย่อยที่ 289 ($\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_2$) และ 287 ($\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_2$) ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดจากการแตกพันธะของ molecular ion เมื่อ side chain แตกออกไป เป็นของ 3β -hydroxystigmaster-5-en-7-one และ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ 3β -hydroxy stigmaster-5-en-7-one (Greca, Monaco & Previtera. 1990 : 1430-1435) 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol (Jones, et al. 1998 : 3786-3789) สูตรโครงสร้างสารประกอบ 3β -hydroxy stigmaster-5-en-7-one และ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol แสดงในภาพประกอบ 44



ภาพประกอบ 44 สูตรโครงสร้างสารประกอบ E1 และ E2 ; 3β -hydroxystigmaster-5-en-7-one และ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol

สารประกอบ F

สารประกอบ F เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 175-178 °C ค่า $R_f = 0.38$ (EtOAc) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3393 cm^{-1} เป็นของหมู่ OH ส่วนแถบดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1754 cm^{-1} เป็นของหมู่ carbonyl lactone แถบดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1654 cm^{-1} เป็นของหมู่ carbonyl และแถบดูดกลืนแสงที่ 1607 cm^{-1} เป็นของหมู่ C=C (ภาพประกอบ 77)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) สัญญาณเรโซแนนซ์ของโปรตอน (ภาพประกอบ 78) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์หมู่ CH_3 3 หมู่ที่ δ 1.06 δ 1.18 และ δ 1.87 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.13 และ δ 2.57 เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 3 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.02 และ δ 2.55 เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 2 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.95 และ δ 2.31 เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 13 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.57 เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 18 มีค่า J เท่ากับ 5.10 Hz ซึ่งต่ออยู่กับหมู่ OH ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.29 มีลักษณะเป็น multiplet (m) เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 4 และ δ 1.45 มีลักษณะเป็น broad triplet (br t) เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 6 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.48 มีลักษณะเป็น multiplet (m) เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 12 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.13 และ δ 6.79 มีลักษณะเป็น broad singlet (br s) เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 14 และ 17 สัญญาณเรโซแนนซ์สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.07 มีลักษณะเป็น doublet of doublets (dd) เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 11 มีค่า J เท่ากับ 15.64 และ 8.52 Hz สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.34 และ δ 6.55 มีลักษณะเป็น doublet (d) เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 7 และ 10 มีค่า J เท่ากับ 10.14 และ 15.64 Hz ตามลำดับ (ตาราง 51)

ตาราง 51 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ F

δ_{H} (ppm)	ตำแหน่ง
2.02(H-2a) 2.55(H-2b) (m)	H-2
1.13(H-3a) 2.57(H-3b) (m)	H-3
1.29 (m)	H-4
1.45 (br t)	H-6
6.34 (d, $J = 10.14$ Hz)	H-7
6.55 (d, $J = 15.64$ Hz)	H-10
6.07 (dd, $J = 15.64$ และ 8.52 Hz)	H-11
2.48 (m)	H-12

ตาราง 51 (ต่อ)

δ_H (ppm)	ตำแหน่ง
1.95(H-13a) 2.31(H-13b) (m)	H-13
5.13 (br s)	H-14
6.79 (br s)	H-17
3.57 (d, $J = 5.10$ Hz)	H-18
1.87 (br s)	H-19
1.18* (br s)	H-20
1.06* (br s)	H-21

หมายเหตุ * อาจสลับที่กันได้

H^1-H^1 COSY NMR spectrum (ภาพประกอบ 79) มีการ coupling ระหว่าง H-6(δ 1.45) กับ H-7(δ 6.34) และ H-4(δ 1.29) และมีการ coupling ระหว่าง H-19(δ 1.87) กับ H-7(δ 6.34) และมีการ coupling ระหว่าง H-2a(δ 2.02) กับ H-2b(δ 2.55) H-3a(δ 1.13) และ H-3b(δ 2.57) และมีการ coupling ระหว่าง H-13b(δ 2.31) กับ H-14(δ 5.13) และ H-13a(δ 1.95) และมีการ coupling ระหว่าง H-12(δ 2.48) กับ H-18(δ 3.57) H-11(δ 6.07) H-13a(δ 1.95) และ H-13b(δ 2.31) และมีการ coupling ระหว่าง H-3b(δ 2.57) กับ H-2a(δ 2.02) H-2b(δ 2.55) H-3a(δ 1.13) และ H-4(δ 1.29) และมีการ coupling ระหว่าง H-14(δ 5.13) กับ H-17(δ 6.79) H-12(δ 2.48) H-13a(δ 1.95) และ H-13b(δ 2.31) และมีการ coupling ระหว่าง H-1(δ 6.07) กับ H-10(δ 6.55) และ H-12(δ 2.48) (ตาราง 52)

ตาราง 52 ข้อมูล $^1H-^1H$ COSY spectrum ของสารประกอบ F

δ_H (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)
1.45 (H-6)	$\leftrightarrow$	6.34 (H-7) 1.29 (H-4)
1.87 (H-19)	$\leftrightarrow$	6.34 (H-7)
2.02 (H-2a)	$\leftrightarrow$	2.55 (H-2b) 1.13 (H-3a) 2.57 (H-3b)
2.31 (H-13b)	$\leftrightarrow$	5.13 (H-14) 1.95 (H-13a)
2.48 (H-12)	$\leftrightarrow$	3.57 (H-18) 6.07 (H-11) 1.95 (H-13a) 2.31 (H-13b)
2.57 (H-3b)	$\leftrightarrow$	2.02 (H-2a) 2.55 (H-2b) 1.13 (H-3a) 1.29 (H-4)
5.13 (H-14)	$\leftrightarrow$	6.79 (H-17) 2.48 (H-12) 1.95 (H-13a) 2.31 (H-13b)
6.07 (H-11)	$\leftrightarrow$	6.55 (H-10) 2.48 (H-12)

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 20 พีค เป็นของคาร์บอน 20 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 80) จาก ^{13}C และ DEPT spectrum (ภาพประกอบ 81) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 8 หมู่ ที่ δ 27.14(C-6) 34.91(C-4) 39.21(C-12) 79.35(C-14) 132.08(C-10) 142.71(C-11) 146.20(C-7) และ 149.53(C-17) สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 4 หมู่ ที่ δ 22.21(C-3) 25.29(C-2) 33.62(C-13) และ 65.47(C-18) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_3 3 หมู่ ที่ δ 11.12(C-19) 16.30(C-21หรือ C-20) และ 28.98(C-20หรือC-21) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ที่ δ 27.73(C-5) 133.84(C-1) 137.82(C-8) 173.22(C=O ของ C-16) และ 193.15(C=O ของ C-9) (ตาราง 53)

ตาราง 53 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ F

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
1 (C)	133.84		
2 (CH_2)	25.29		25.29
3 (CH_2)	22.21		22.21
4 (CH)	34.91	34.91	34.91
5 (C)	27.73		
6 (CH)	27.14	27.14	27.14
7 (CH)	146.20	146.20	146.20
8 (C)	137.82		
9 (C=O)	193.15		
10 (CH)	132.08	132.08	132.08
11 (CH)	142.71	142.71	142.71
12 (CH)	39.21	39.21	39.21
13 (CH_2)	33.62		33.62
14 (CH)	79.35	79.35	79.35
16 (C=O)	173.22		
17 (CH)	149.53	149.53	149.53
18 (CH_2)	65.47		65.47
19 (CH_3)	11.12		11.12
20 (CH_3)	28.98 *		28.98
21 (CH_3)	16.31 *		16.31

หมายเหตุ * อาจสลับที่กันได้

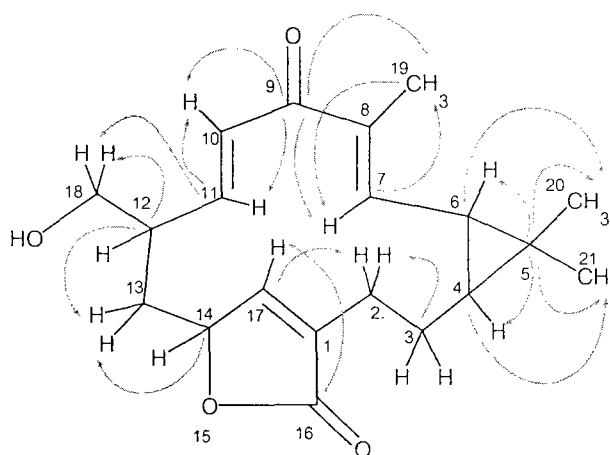
HMQC spectrum (ภาพประกอบ 82) แสดงถึงโปรตอนที่สร้างพันธะกับคาร์บอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล แสดงดังข้อมูล (ตาราง 54) และ HMBC spectrum (ภาพประกอบ 83) แสดงถึงความสัมพันธ์ของคาร์บอนในโมเลกุลกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล (ตาราง 55 ภาพประกอบ 45)

ตาราง 54 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ F

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
133.84 (C-1)		C-1
25.29 (C-2)	2.02 (H-2a) 2.55 (H-2b)	CH ₂ -2
22.21 (C-3)	1.13 (H-3a) 2.57 (H-3b)	CH ₂ -3
34.91 (C-4)	1.29 (H-4)	CH-4
27.73 (C-5)		C-5
27.14 (C-6)	1.45 (H-6)	CH-6
146.20 (C-7)	6.34 (H-7)	CH-7
137.82 (C-8)		C-8
193.15 (C-9)		C-9
132.08 (C-10)	6.55 (H-10)	CH-10
142.71 (C-11)	6.07 (H-11)	CH-11
39.21 (C-12)	2.48 (H-12)	CH-12
33.62 (C-13)	1.95 (H-13a) 2.31 (H-13b)	CH ₂ -13
79.35 (C-14)	5.13 (H-14)	CH-14
- (O-15)		
173.22 (C-16)		C-16
149.53 (C-17)	6.79 (H-17)	CH-17
65.47 (C-18)	3.57 (H-18)	CH ₂ -18
11.12 (C-19)	1.87 (H-19)	CH ₃ -19
28.98 (C-20)	1.18 (H-20)	CH ₃ -20
16.31 (C-21)	1.06 (H-21)	CH ₃ -21

ตาราง 54 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ F

δ_c (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)			
193.15 (C-9)	$\leftrightarrow$	1.87 (H-19)	6.07 (H-11)	6.34 (H-7)	6.55 (H-10)
173.22 (C-16)	$\leftrightarrow$	6.79 (H-17)			
149.53 (C-17)	$\leftrightarrow$	2.57 (H-3b)	2.02 (H-2a)		
146.20 (C-7)	$\leftrightarrow$	1.87 (H-19)			
142.71 (C-11)	$\leftrightarrow$	2.31 (H-13b)	2.48 (H-12)	3.57 (H-18)	6.55 (H-10)
137.82 (C-8)	$\leftrightarrow$	1.45 (H-6)	1.87 (H-19)	6.34 (H-7)	
133.84 (C-1)	$\leftrightarrow$	2.02 (H-2a)	1.13 (H-3a)	6.79 (H-17)	
79.35 (C-14)	$\leftrightarrow$	2.31 (H-13b)	6.79 (H-17)		
65.47 (C-18)	$\leftrightarrow$	2.48 (H-12)	6.07 (H-11)		
39.21 (C-12)	$\leftrightarrow$	2.31 (H-13b)	1.95 (H-13a)	3.57 (H-18)	6.55 (H-10)
		6.07 (H-11)			
34.91 (C-4)	$\leftrightarrow$	1.06 (H-21)	1.18 (H-20)	1.45 (H-6)	6.34 (H-7)
33.62 (C-13)	$\leftrightarrow$	3.57 (H-18)	6.07 (H-11)		
28.98 (C-20)	$\leftrightarrow$	1.45 (H-6)	1.29 (H-4)		
27.73 (C-5)	$\leftrightarrow$	1.06 (H-21)	1.18 (H-20)	1.29 (H-4)	1.45 (H-6)
27.14 (C-6)	$\leftrightarrow$	1.06 (H-21)	1.18 (H-20)		
25.29 (C-2)	$\leftrightarrow$	6.79 (H-17)			
22.21 (C-3)	$\leftrightarrow$	2.02 (H-2a)			
11.12 (C-19)	$\leftrightarrow$	6.34 (H-7)			

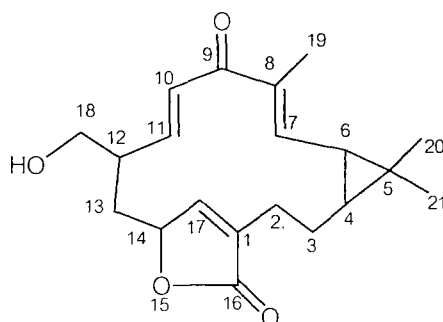


ภาพประกอบ 45 แสดงความสัมพันธ์ของคาร์บอนกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ

ในโมเลกุลของสารประกอบ F

HRFAB⁺ แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 331.19094 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{26}O_4$ คำนวณสำหรับ $C_{20}H_{27}O_4$ 331.19092

จากข้อมูลของสารประกอบ F เมื่อนำมาเขียนโครงสร้างพบว่าเป็นอนุพันธ์ของ cembrane และเขียนโครงสร้างโดยใช้โปรแกรม CS ChemDraw Ultra® Chemical Structure Drawing Standard © 1985-1998 Cambridge Soft Corporation และให้โปรแกรมเรียกชื่อได้เป็น 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione ซึ่งสารประกอบนี้ไม่พบว่าเคยมีรายงานการค้นพบมาก่อน สูตรโครงสร้างสารประกอบ 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione แสดงในภาพประกอบ 46



ภาพประกอบ 46 สูตรโครงสร้างสารประกอบ F ; 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione

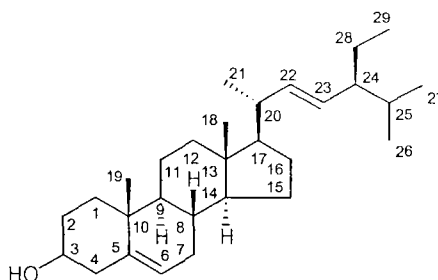
สารประกอบ G

สารประกอบ G เป็นผลึกสีขาวจุดหลอมเหลว 165-166 °C ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ hydroxy ที่ $3,422\text{ cm}^{-1}$ ที่ $2,936\text{ cm}^{-1}$ $1,465\text{ cm}^{-1}$ $1,383\text{ cm}^{-1}$ เป็นของหมู่ CH CH_2 CH_3 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 84)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.65 – 1.02 ที่ CH_2 และ CH ปรากฏสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.02 – 2.35 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.51 เป็นของ H-3 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ δ 5.05 เป็นของ H-23 และ δ 5.15 เป็นของ H-22 สำหรับ H-6 ปรากฏสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.15 (ภาพประกอบ 85)

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสารประกอบ G เปรียบเทียบกับข้อมูล ^1H และ ^{13}C ของ stigmasterol (Pouchert & Behke. 1993 : 569) สรุปได้ว่าสารประกอบ G คือ stigmasterol (24α ethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol) สูตรโครงสร้างสารประกอบ stigmasterol แสดงในภาพประกอบ 47



ภาพประกอบ 47 สูตรโครงสร้างสารประกอบ G ; stigmasterol

สาร H

สาร H เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 201-205 °C (จุดหลอมเหลว stigmastera-4,22-dien-6 β -ol-3-one เท่ากับ 210 – 213 °C และ stigmaster-4-en-6 β -ol-3-one เท่ากับ 211 – 213 °C Katsui, et al. 1972 : 223-226) ค่า $R_f = 0.50$ (hexane:EtOAc 1:1) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.73-1.30 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ปรากฏที่ δ 0.94-2.57 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.34 มีลักษณะเป็น singlet (s) เป็นของ H-6 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.96 – 5.17 มีลักษณะเป็น multiplet (m) เป็นของ H-22 และ H-23 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.80 มีลักษณะเป็น singlet (s) เป็นของ H-4 (ภาพประกอบ 86)

จากข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร H จะเหมือนกับข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร D คือสาร stigmast-4-en-6 β -ol-3-one และ stigmas-4,22-dien-6 β -ol-3-one ซึ่งเป็นสารที่แยกได้ในส่วนของสารสกัด hexane

สารประกอบ I

สารประกอบ I เป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 182-184 °C (จุดหลอมเหลว aurantiamide acetate เท่ากับ 185-186 °C Talapatra, Mallik & Talapatra. 1980 :1199-1202) ค่า R_f = 0.30 (hexane:EtOAc 1:1) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3,313 cm^{-1} (NH) 1,726 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ของ ester 1,661 cm^{-1} และ 1,632 cm^{-1} เป็นของหมู่ carbonyl ของ amide 1,261 cm^{-1} (C-O) และการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 746 cm^{-1} และ 698 cm^{-1} เป็นของ =CH ที่แสดง monosubstituted phenyl (ภาพประกอบ 87)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 1 หมู่ ที่ δ 2.03 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.76 เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 11 ซึ่งต่อกับหมู่ phenyl สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.08 และ 3.24 มีลักษณะเป็น doublet of doublet (dd) เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 10 ซึ่งต่อกับหมู่ phenyl มีค่า J เท่ากับ 13.56 และ 8.43 Hz สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.83 และ 3.94 มีลักษณะเป็น dd เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 3 มีค่า J เท่ากับ 11.31 และ 4.22 Hz สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.35 และ 4.79 เป็นของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 4 และ 7 ตามลำดับ สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.05 และ 6.80 มีลักษณะเป็น doublet (d) เป็นของหมู่ NH ที่ตำแหน่ง 5 และ 8 ซึ่งต่อกับหมู่ phenyl มีค่า J เท่ากับ 8.5 และ 7.51 Hz ตามลำดับ ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏในช่วง δ 7.08 – 7.72 เป็นของหมู่ CH ของหมู่ phenyl ทั้ง 3 หมู่ (ตาราง 56 และภาพประกอบ 88)

ตาราง 56 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ I

δ_{H} (ppm)	ตำแหน่ง
2.03 (br s)	H-1
3.83 (H-3a) 3.94 (H-3b) (dd, $J = 11.31$ และ 4.22 Hz)	H-3
4.35 (m)	H-4
6.05 (d, $J = 8.50$ Hz)	NH-5
4.79 (m)	H-7
6.05 (d, $J = 7.51$ Hz)	NH-8
3.08 (H-10a) 3.24 (H-10b) (dd, $J = 13.56$ และ 8.43 Hz)	H-10
2.76 (m)	H-11
7.08-7.72	H-phenyl

^1H - ^1H COSY spectrum (ภาพประกอบ 89) มีการ coupling ระหว่าง H-4 (δ 4.35) กับ H-3 (δ 3.83 และ 3.94) H-11 (δ 4.35) และ NH-5 (δ 6.05) และมีการ coupling ระหว่าง H-7 (δ 4.79) กับ H-10 (δ 3.08 และ 3.24) H-11 (δ 4.35) และ NH-8 (δ 6.80) (ตาราง 57)

ตาราง 57 ข้อมูล ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ I

δ_{H} (ppm)	ความสัมพันธ์กับ δ_{H} (ppm)					
2.76 (H-11)	$\leftrightarrow$	4.35 (H-4)				
3.08 (H-10a)	$\leftrightarrow$	3.24 (H-10b)	4.79 (H-7)			
3.24 (H-10b)	$\leftrightarrow$	3.08 (H-10a)	4.79 (H-7)			
3.83 (H-3a)	$\leftrightarrow$	3.94 (H-3b)	4.35 (H-4)			
3.94 (H-3b)	$\leftrightarrow$	3.83 (H-3a)	4.35 (H-4)			
4.35 (H-4)	$\leftrightarrow$	2.76 (H-11)	3.83 (H-3a)	3.94 (H-3b)	6.05 (NH-5)	
4.79 (H-7)	$\leftrightarrow$	3.08 (H-10a)	3.24 (H-10b)	6.80 (NH-8)		
6.05 (NH-5)	$\leftrightarrow$	4.35 (H-4)				
6.80 (NH-8)	$\leftrightarrow$	4.79 (H-7)				

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 21 พีค เป็นของคาร์บอน 27 คาร์บอนในโมเลกุล เนื่องจากมีบางสัญญาณที่ปรากฏที่ค่า δ ตำแหน่งเดียวกัน (ภาพประกอบ 90) จาก ^{13}C และ DEPT spectrum (ภาพประกอบ 91) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 17 หมู่ ที่ δ 49.40(C-4') 54.96(C-7) 126.73(C-4'') 127.04(C-2''' C-6''') 127.12(C-4') 128.56(C-3''' C-5''') 128.62(C-2' C-6') 128.73(c-2'' C-6'') 129.11(c-3' C-5') 129.28(C-3'' C-5'') และ 131.91(C-4''') สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 3 หมู่ ที่ δ 37.41 (C-11) 38.43(C-10) และ 64.55(C-3) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_3 1 หมู่ ที่ δ 20.80 (C-1) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ที่ δ 133.62(C-1''') 136.59(C-1'') 136.67(C-1') 167.08(C=O ของ C-9) 170.21(C=O ของ C-6) และ 170.77(C=O ของ C-2) (ตาราง 58)

ตาราง 58 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ I

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
1 (CH_3)	20.80		20.80
2 ($\text{C}=\text{O}$)	170.78		
3 (CH_2)	64.55		64.55
4 (CH)	49.40	49.40	49.40
5			
6 ($\text{C}=\text{O}$)	170.22		
7 (CH)	54.96	54.96	54.96
8			
9 ($\text{C}=\text{O}$)	167.09		
10 (CH_2)	38.43		38.43
11 (CH_2)	37.41		37.41
1' (C)	136.67		
2' (CH)	128.62	128.62	128.62
3' (CH)	129.11	129.11	129.11
4' (CH)	127.12	127.12	127.12
5' (CH)	129.11	129.11	129.11
6' (CH)	128.62	128.62	128.62
1'' (C)	136.59		
2'' (CH)	128.73	128.73	128.73
3'' (CH)	129.28	129.28	129.28
4'' (CH)	126.73	126.73	126.73
5'' (CH)	129.28	129.28	129.28
6'' (CH)	128.73	128.73	128.73
1''' (C)	133.62		
2''' (CH)	127.04	127.04	127.04
3''' (CH)	128.56	128.56	128.56
4''' (CH)	131.91	131.91	131.91
5''' (CH)	128.56	128.56	128.56
6''' 1(CH)	127.04	127.04	127.04

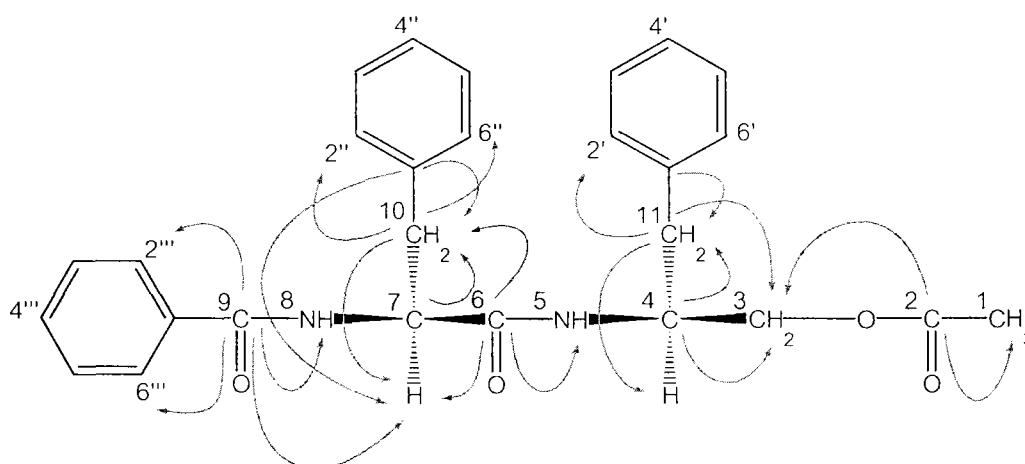
HMQC spectrum (ภาพประกอบ 92) แสดงถึงโปรตอนที่เกี่ยวข้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล แสดงดังตาราง 59 และ HMBC spectrum (ภาพประกอบ 93) แสดงถึงความสัมพันธ์ของคาร์บอนในโมเลกุลกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล (ตาราง 60 และ ภาพประกอบ 48)

ตาราง 59 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ I

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H	
64.55 (C-3)	3.83 (H-3a) 3.94 (H-3b)	CH ₂ -3	
54.96 (C-7)	4.79 (H-7)	CH-7	
49.40 (C-4)	4.35 (H-4)	CH-4	
38.43 (C-10)	3.08 (H-10a) 3.24 (H-10b)	CH ₂ -10	
37.41 (C-11)	2.76 (H-11)	CH ₂ -11	
20.80 (C-1)	2.03 (H-1)	CH ₃ -1	

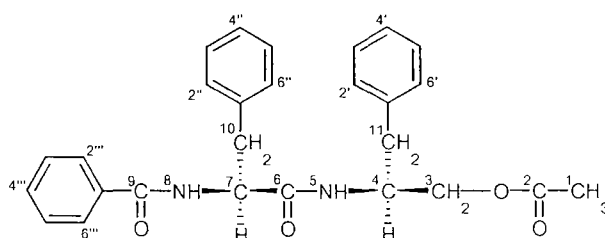
ตาราง 60 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ I

δ_c (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)			
170.78 (C-2)	↔	2.03 (H-1)	3.83 (H-3a)	3.94 (H-3b)	
170.22 (C-6)	↔	3.08 (H-10a)	3.24 (H-10b)	4.79 (H-7)	6.05 (NH-5)
167.09 (C-9)	↔	4.79 (H-7)	6.80 (NH-8)	7.72 (H-2''' H-6''')	
136.67 (C-1')	↔	2.76 (H-11)			
136.59 (C-1'')	↔	3.08 (H-10a)	3.27 (H-10b)	4.79 (H-7)	
54.96 (C-7)	↔	3.08 (H-10a)	3.24 (H-10b)		
49.40 (C-4)	↔	2.76 (H-11)	3.83 (H-3a)	3.94 (H-3b)	
38.43 (C-10)	↔	4.79 (H-7)	7.26 (H-2'' H-6'')		
37.41 (C-11)	↔	3.83 (H-3a)	3.94 (H-3b)	4.35 (H-4)	7.08 (H-2' H-6')



ภาพประกอบ 48 แสดงความสัมพันธ์ของคาร์บอนกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ
ในโมเลกุลของสารประกอบ I

จากข้อมูลของสารประกอบ I สรุปได้ว่าสารประกอบ I คือ aurantiamide acetate ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ aurantiamide acetate ที่แยกได้จาก *Piper auranticum* (Banrji & Ray. 1981 : 2217-2220) *Acantophora spicifera* (Wahidulla, D'Souza & Kamat. 1991 : 3323-3325) และจากหน้าลิ้นงู *Hedyotis corymbosa* Lamk. (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. 2544) สูตรโครงสร้างสารประกอบ aurantiamide acetate แสดงในภาพประกอบ 49



ภาพประกอบ 49 สูตรโครงสร้างสารประกอบ I ; aurantiamide acetate

สาร J

สาร J เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 136-140 °C (จุดหลอมเหลว 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one เท่ากับ 140-141 °C Das & Srinivas. 1992 : 2427-2429 และของ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol เท่ากับ 149 °C Jones, *et al.* 1998 : 3786-3789) ค่า R_f = 0.35 (hexane:EtOAc 1:1) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.66-1.18 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ปรากฏที่ δ 1.00-2.51 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.05-3.78 มีลักษณะเป็น multiple (m) เป็นของ H-3 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.95 – 5.21 มีลักษณะเป็น multiplet (m) เป็นของ H-22 และ H-23 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.67 มีลักษณะเป็น singlet (s) เป็นของ H-6 (ภาพประกอบ 94)

จากข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร J จะเหมือนกับข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร E สารผสมระหว่าง 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one และ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol ซึ่งเป็นสารที่แยกได้ในส่วนของสารสกัด hexane

สารประกอบ K

สารประกอบ K เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 195-197 °C (จุดหลอมเหลวของ scopoletin เท่ากับ 205 °C Razdan, *et al.* 1987 : 2063-2069) ค่า R_f = 0.40 (CHCl_3 :EtOAc 1:1) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $3,339\text{ cm}^{-1}$ เป็นของหมู่ OH $1,705\text{ cm}^{-1}$ เป็นของหมู่ carbonyl lactone และแถบการดูดกลืนแสงที่ $1,566\text{ cm}^{-1}$ เป็นการสั่นแบบยืดของพันธะคาร์บอนของวงอะโรมาติก (ภาพประกอบ 95)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) สัญญาณเรโซแนนซ์ของโปรตอน (ภาพประกอบ 96) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์หมู่ CH_3 1 หมู่ ที่ δ 3.94 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.20 เป็นของหมู่ OH ที่ตำแหน่งที่ 7 ซึ่งสามารถตรวจสอบและยืนยันได้ด้วยการเติม D_2O พบว่าสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.20 จะหายไป (ภาพประกอบ 97) สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.25 มีลักษณะเป็น doublet (d) มีค่า J เท่ากับ 9.48 Hz เป็นสัญญาณของหมู่ CH ที่ตำแหน่งที่ 3 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.83 และ 6.90 มีลักษณะเป็น singlet (s) เป็นสัญญาณของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 5 และ 8 ตามลำดับ ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 7.59 มีลักษณะเป็น doublet (d) มีค่า J เท่ากับ 9.48 Hz เป็นสัญญาณของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 4 (ตาราง 61)

ตาราง 61 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ K

δ_{H} (ppm)	ตำแหน่ง
6.25 (d, J 9.44 Hz)	H-3
7.59 (d, J 9.48 Hz)	H-4
6.83 (s)	H-5
6.90 (s)	H-8
6.20 (br s, D_2O exch.)	-OH
3.94 (s)	$-\text{OCH}_3$

^1H - ^1H COSY spectrum (ภาพประกอบ 98) มีการสัมพันธ์กันระหว่าง H-3(δ 6.25) กับ H-4 (δ 7.59) (ตาราง 62)

ตาราง 62 ข้อมูล ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ K

δ_{H} (ppm)	ความสัมพันธ์กับ δ_{H} (ppm)
6.25 (H-3)	7.59 (H-4)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 Hz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 10 พีค (ภาพประกอบ 99) เป็นของคาร์บอน 10 คาร์บอนในโมเลกุล จาก ^{13}C และ DEPT spectra (ภาพประกอบ 100) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 1 หมู่ ที่ δ 56.40 ($\text{O}-\text{CH}_3$) สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH 4 หมู่ ที่ δ 103.18(C-8) 107.48(C-5) 113.38(C-3) และ 143.30(C-4) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ที่ 111.48(C-10) 144.01(C-6) 149.70(C-9) 150.24(C-7) และ 161.45 (C-2) (ตาราง 63)

ตาราง 63 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ K

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_{c} (ppm)	DEPT-90 δ_{c} (ppm)	DEPT-135 δ_{c} (ppm)
2 (C=O)	161.45		
3 (CH)	113.38	113.38	113.38
4 (CH)	143.30	143.30	143.30
5 (CH)	107.49	107.49	107.49
6 (C)	144.01		
7 (C)	150.24		
8 (CH)	103.18	103.18	103.18
9 (C)	149.70		
10 (C)	111.48		
-OCH ₃	56.40		56.40

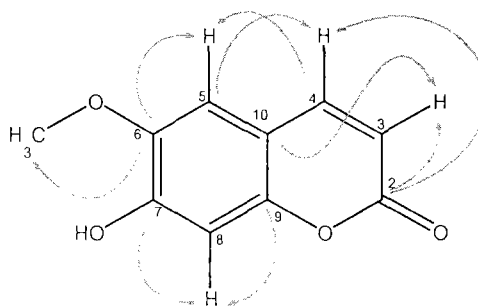
จาก HMQC spectrum (ภาพประกอบ 101) แสดงถึงโปรตอนที่เกี่ยวข้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล แสดงดังข้อมูล (ตาราง 64) และ HMBC spectrum (ภาพประกอบ 102) แสดงถึงความสัมพันธ์ของคาร์บอนในโมเลกุลกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล (ตาราง 65 และภาพประกอบ 50)

ตาราง 64 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ K

δ_{c} (ppm)	δ_{H} (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
143.30 (C-4)	7.59 (H-4)	CH-4
113.38 (C-3)	6.25 (H-3)	CH-3
107.49 (C-5)	6.83 (H-5)	CH-5
103.18 (C-8)	6.90 (H-8)	CH-8
56.40 (-OCH ₃)	3.94 (-OCH ₃)	(-OCH ₃)

ตาราง 65 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ K

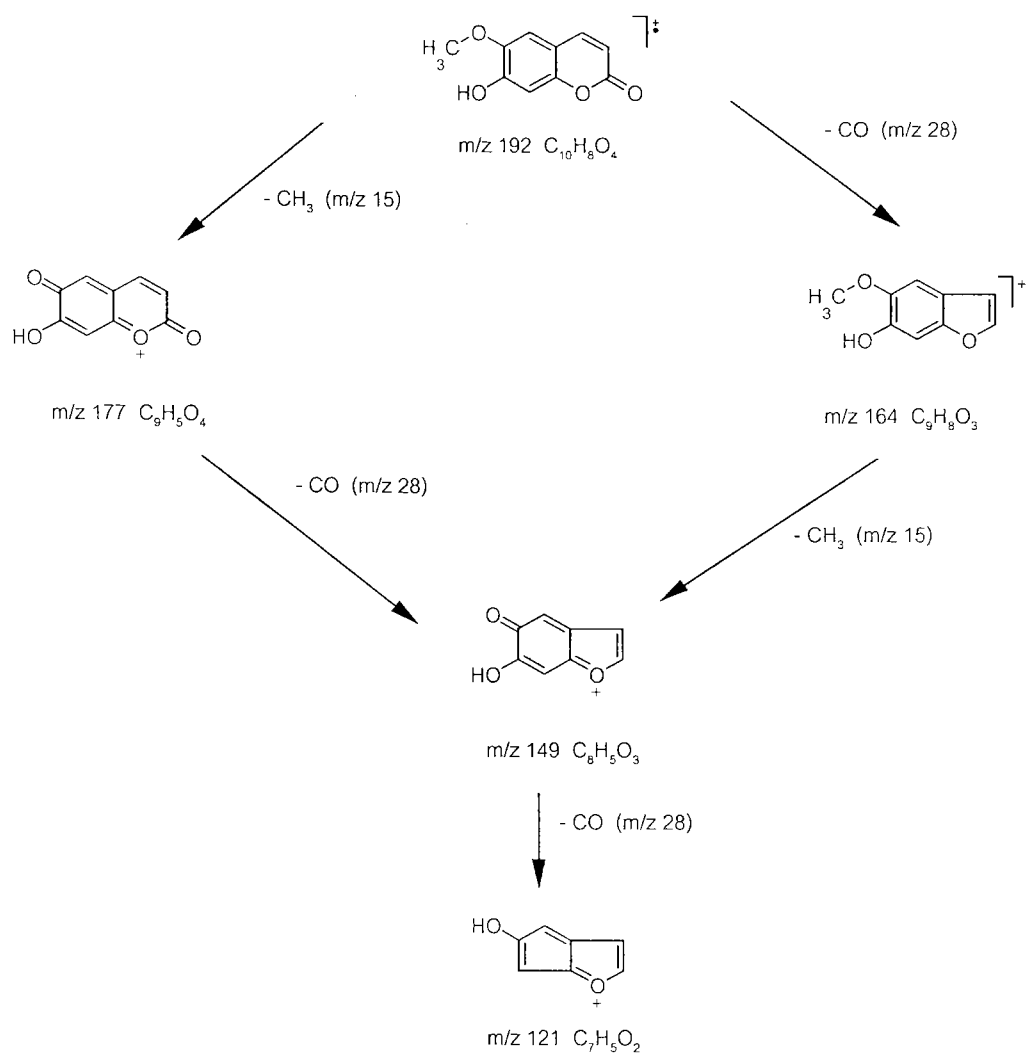
δ_c (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)		
161.45 (C-2)	$\leftrightarrow$	6.25 (H-3)	7.59 (H-4)	
150.24 (C-7)	$\leftrightarrow$	6.83 (H-5)	6.90 (H-8)	
149.70 (C-9)	$\leftrightarrow$	6.83 (H-5)	6.90 (H-8)	
144.01 (C-6)	$\leftrightarrow$	6.83 (H-5)	6.90 (H-8)	3.94 (-OCH ₃)
143.30 (C-4)	$\leftrightarrow$	6.83 (H-5)		
111.48 (C-10)	$\leftrightarrow$	6.25 (H-3)	6.90 (H-8)	
107.49 (H-5)	$\leftrightarrow$	7.59 (H-4)		



ภาพประกอบ 50 แสดงความสัมพันธ์ของคาร์บอนกับโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ

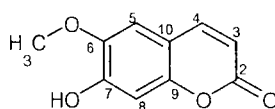
ในโมเลกุลของสารประกอบ K

EIMS spectrum ของสารประกอบ K (ภาพประกอบ 103) ให้สัญญาณ m/z (% relative intensity) ของ $C_{10}H_8O_4$ ที่ 192 $[M]^+$ (100) สำหรับพีคของไอออนย่อยปรากฏที่ 177 $[M-CH_3]^+$ (46) 164 $[M-CO]^+$ (43) 149 $[M-C_2H_3O]^+$ (59) และ 121 $[M-C_3H_3O_2]^+$ (27) (ภาพประกอบ 51)



ภาพประกอบ 51 การแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบ K

จากข้อมูลของสารประกอบ K สรุปได้ว่าสารประกอบ K คือ scopoletin ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ scopoletin (Razdan, *et al.* 1987 : 2063-2069) สูตรโครงสร้างสารประกอบ scopoletin แสดงในภาพประกอบ 52



ภาพประกอบ 52 สูตรโครงสร้างสารประกอบ K ; scopoletin

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สารสกัดที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อนโดยใช้ hexane และ CH_2Cl_2 เป็นตัวสกัดตามลำดับ สารสกัด hexane เมื่อแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย hexane: CHCl_3 CHCl_3 CHCl_3 :EtOAc EtOAc และ MeOH เป็นตัวชะตามลำดับ แยกได้สาร 15 กลุ่ม (H1-H15) และสารสกัด CH_2Cl_2 เมื่อแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย hexane: CHCl_3 CHCl_3 CHCl_3 :EtOAc และ EtOAc:MeOH เป็นตัวชะตามลำดับ แยกได้สาร 6 กลุ่ม (D1-D6) ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีขององค์ประกอบหลักของสารสกัดทั้งสองที่แยกได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีพบว่าสารสกัด hexane พบสารบริสุทธิ์ 3 สาร และของผสมที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน 2 สาร อีกจำนวน 3 กลุ่ม ในสารสกัด CH_2Cl_2 พบสารบริสุทธิ์อีกจำนวน 3 สาร และของผสมที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน 2 สาร อีกจำนวน 2 กลุ่ม ซึ่งของผสมสองกลุ่มนี้เป็นกลุ่มสารที่เหมือนกับในส่วนสารสกัด hexane

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัด hexane จำนวน 3 สาร คือ 3β -O-acetylaleuritolic acid ซึ่งเป็นสารที่แยกได้ในงานวิจัยของ อนันต์ (อนันต์ คงชุม. 2544) หน้า 160 mg คิดเป็น 6.15% ของสารกลุ่ม H11 มีรายงานการค้นพบสารประกอบ 3β -O-acetylaleuritolic acid ในเมล็ดของ *Phytolacca americana* (Woo & Wagner. 1997 : 1845-1846) ในรากของ *Maprounea africana* (Chaudhuri, et. al. 1995 : 1-9) และในเปลือกของ *Aleurites montana* (Misra & Khastgir. 1970 : 3017-3021) สารประกอบ 3β -O-acetylaleuritolic acid มีค่า ED_{50} เท่ากับ 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งมีรายงานว่ามิฤทธิ์ในการต้านจุลชีพชนิด *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella typhimurium* มีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งต่ำสุดเท่ากับ 0.1 mg/mL (Peres, et. al. 1997 : 223-226) นอกจากนี้ พบสารใหม่ที่ไม่เคยพบในพืชชนิดใดมาก่อนอีก 2 สารคือ 3β -acetoxo-16-hydroxyoleanan-28,13-olide และ 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxatricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione สารประกอบ 3β -acetoxo-16-hydroxyoleanan-28,13-olide แยกได้จากสารกลุ่ม H13 ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงมีค่า ED_{50} เท่ากับ 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ มีค่า ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำหนักสารบริสุทธิ์ที่แยกออกมาได้หนัก 15 mg คิดเป็น 0.60% ของสารกลุ่ม H13 ซึ่งมีปริมาณน้อยมากและคาดว่าสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในสารกลุ่ม H13 นั้นยังคงอยู่ใน

ส่วนของของเหลวหนืดที่ไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ออกมาได้ ส่วนสารกลุ่ม H13.3 H13.4.1 H13.4.3 และ H13.4.4 เป็นกลุ่มสารที่แยกได้มาจากสารกลุ่ม H13 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษสูง และเป็นกลุ่มที่น่าสนใจแต่สารที่แยกได้มีปริมาณสารน้อยมากและมีสารผสมกันอยู่หลายชนิด จึงนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่ามีความ ED_{50} เท่ากับ 27 15 21 และ 23 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ส่วนสารประกอบ 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}] heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione แยกได้จากสารกลุ่ม H15 ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ แต่สารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีความ ED_{50} เท่ากับ 32 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อพิจารณาน้ำหนักสารที่แยกได้หนัก 23 mg คิดเป็น 1.53% ของสารกลุ่ม H15 ทำให้สารประกอบนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก แต่ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะสูงขึ้นเมื่ออยู่ในลักษณะของสารบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังพบของผสมที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน 2 สารผสมกัน อีกจำนวน 3 กลุ่ม ของผสมที่แยกได้นี้เป็นสารที่พบได้โดยทั่วไปในพืชชั้นสูง คือ stigmastan-3,6-dione กับ stigmast-22-en-3,6-dione พบในพืช *Pistia stratiotes* (Monaco & Previtera. 1991 :2420-2422) stigmast-4-en-6 β -ol-3-one กับ stigmasta-4,22-dien-6 β -ol-3-one พบในพืช *Phoenix dactylifera* (Fernandez, Pedro & Seoane. 1983 : 2087-2088) *Mangifera indica* (Anjaneyulu, et. al. 1999 : 1229-1236) และ 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one กับ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol พบในพืช *Iris missouriensis* (Wong, et. al. 1986 : 330-333) *Eufhorbia fischeriana* (Schraeder, et. al. 1980 : 2213-2215) สารที่แยกได้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัด CH_2Cl_2 จำนวน 3 สาร คือ stigmasterol aurantiamide acetate และ scopoletin สารประกอบ stigmasterol แยกได้จากสารกลุ่ม D5.1 หนัก 108 mg คิดเป็น 8.85% มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำมีความ ED_{50} เท่ากับ 43 $\mu\text{g/mL}$ เป็น steroid ซึ่งพบได้ในถั่วเหลือง *Glycine max* (Webber. 1977 : 1849-1851) ในเปลือกและลำต้นของ *Harisania abyssinica* (Balde, et. al. 1999 : 67-69) และจากรายงานฤทธิ์ในการต้านโปรโตซัว (protozoa) ของ stigmasterol ซึ่งแยกได้จาก *Guarea rhopalocarpa* มีฤทธิ์ต้าน *Leishmania donovani* *trypanosoma brucei brucei* และ *Plasmodium falciparum* ต่ำกว่า pentamidine และ pentostam ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว (Camacho, et. al. 2001 : 203-210) สารประกอบ aurantiamide acetate แยกได้จากสารกลุ่ม D5.2 หนัก 68 mg คิดเป็น 1.78% มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำมีความ ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ มีงานวิจัยที่รายงานการค้นพบสารประกอบ aurantiamide acetate ที่แยกได้จาก *Piper aurantiacum* Wall. (Banrji & Das. 1975 : 1234-1236) *Dendrobium gibsonii* Lindl.

(Tlapatra, et al. 1985 : 2765-2769) *Hypericum japonicum* (Ishiguro, et al. 1991 : 3639-3641) และมีรายงานมีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ของ aurantiamide acetate ที่แยกได้จาก *Pteris multifida* ให้ผลดีกว่า luteolin และ apigenin (Lu, et al. 1999 : 586-587) จากรายงานของชายและคณะ (Tsai, et al. 1998 : 1663-1666) พบว่าเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดีกว่า trifluoperazine และสารประกอบ scopoletin ซึ่งแยกได้จาก สารกลุ่ม D5.2 น้ำหนัก 54 mg คิดเป็น 1.42% มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตัวมีค่า ED₅₀ มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ สารประกอบนี้ค้นพบและแยกได้จาก *Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana* (shafizadeh & Melnikoff. 1970 : 1311-1316) *Artemisia dracunculoides* Pursh. (Herz, Bhat & Santhanam. 1970 : 891-894) *Xeromphis obovata* (Sibanda, et al. 1989 : 1550-1552) มีการศึกษาสารประกอบ scopoletin ที่แยกได้จาก *Pelargonium reniforme* มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Proteus mirabilis* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Haemophilus influenzae* ต่ำกว่า penicillin G และ erythromycin (Kayser & Kalodziej. 1997 : 508-510) จากรายงานของซิลวานและคณะ (Silvan, et al. 1996 : 1183-1185) พบว่า scopoletin ที่แยกได้จาก *Santolina oblongifolia* เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเยื่อช่องท้องของหนูพบว่า มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ Indomethacin และในสารสกัด CH_2Cl_2 ยังพบของผสมที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน 2 ที่พบในสารสกัด hexane คือสารผสมระหว่าง stigmaster-4-en-6 β -ol-3-one กับ stigmaster-4,22-dien-6 β -ol-3-one และ 3 β -hydroxystigmaster-5-en-7-one กับ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol

ในสารสกัด CH_2Cl_2 นอกจากสารบริสุทธิ์และของผสมที่แยกได้ยังคงมีสารกลุ่ม D5.2.3.1 D5.2.3.3 D5.2.4.1 D5.2.4.2 D5.2.4.3 D5.2.4.4 D5.2.5.1 D5.2.5.3 D5.2.5.4 D5.3.1 D5.3.2 และ D5.3.3 ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่น่าสนใจแต่ปริมาณสารน้อยมากไม่สามารถแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เนื่องจากเป็นกลุ่มสารที่แยกได้มาจากกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษสูง จึงนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบพบว่า มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 22 27 13 11 18 15 13 11 22 12 21 และ 16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

สารที่แยกได้และกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงมีรายละเอียดค่า ED₅₀ น้ำหนักสาร และร้อยละของสารที่แยกได้สรุปในตาราง 66 และตาราง 67

ตาราง 66 แสดงค่า ED₅₀ และปริมาณร้อยละของสารที่แยกได้

สาร	สมบัติทางกายภาพ ลักษณะ	mp °C	ED ₅₀ (μg/mL)	น้ำหนัก (mg)	% สารที่แยกได้
A	ผลึกสีขาว	299-300	22	160	6.15 ของสารกลุ่ม H11
B	ของแข็งสีขาว	187-190	>100	110	4.23 ของสารกลุ่ม H11
C	ของแข็งสีขาว	266-268	>100	15	0.60 ของสารกลุ่ม H13
D*	ของแข็งสีขาว	201-205	>100	72	3.00 ของสารกลุ่ม H14
E**	ของแข็งสีขาว	136-140	70	97	4.04 ของสารกลุ่ม H14
F	ผลึกรูปเข็มสีขาว	175-178	32	23	1.53 ของสารกลุ่ม H15
G	ผลึกสีขาว	165-166	43	108	8.85 ของสารกลุ่ม D5.1
H*	ของแข็งสีขาว	201-205	>100	37	0.97 ของสารกลุ่ม D5.2
I	ผลึกสีขาว	182-184	>100	68	1.78 ของสารกลุ่ม D5.2
J**	ของแข็งสีขาว	136-140	70	54	1.42 ของสารกลุ่ม D5.2
K	ผลึกรูปเข็มสีขาว	195-197	>100	48	1.26 ของสารกลุ่ม D5.2

หมายเหตุ * ** เป็นสารชนิดเดียวกัน

สารประกอบและของผสมที่แยกได้มีชื่อดังนี้

(A) 3β-O-acetylaleuritolic acid

(B) (B) stigmastan-3,6-dione กับ stigmast-22-en-3,6-dione

(C) 3β-acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide

(D) stigmast-4-en-6β-ol-3-one กับ stigmasta-4,22-dien-6β-ol-3-one

(E) 3β-hydroxystigmast-5-en-7-one กับ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol

(F) 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione

(G) stigmasterol

(H) stigmast-4-en-6β-ol-3-one กับ stigmasta-4,22-dien-6β-ol-3-one

(I) aurantiamide acetate

(J) 3β-hydroxystigmast-5-en-7-one กับ 7-oxo-5,6-dihydrostigmasterol

(K) scopoletin

ตาราง 67 แสดงค่า ED₅₀ และปริมาณร้อยละของสารผสมในสารสกัด hexane และ CH₂Cl₂

สารกลุ่ม	ED ₅₀ (μg/mL)	น้ำหนัก (mg)	% สารที่แยกได้
H13.3	27	870	34.80 ของสารกลุ่ม H13
H13.4.1	15	180	7.20 ของสารกลุ่ม H13
H13.4.3	21	120	4.80 ของสารกลุ่ม H13
H13.4.4	23	70	2.80 ของสารกลุ่ม H13
D5.2.3.1	22	50	1.31 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.3.3	27	140	3.68 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.4.1	13	20	0.52 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.4.2	11	80	2.10 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.4.3	18	80	2.10 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.4.4	15	30	0.78 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.5.1	13	20	0.52 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.5.3	11	80	2.10 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.2.5.4	22	100	2.63 ของสารกลุ่ม D5.2
D5.3.1	12	40	2.53 ของสารกลุ่ม D5.3
D5.3.2	21	720	48.56 ของสารกลุ่ม D5.3
D5.3.3	16	420	26.58 ของสารกลุ่ม D5.3

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 กลุ่มสารที่แยกได้ที่มีความเป็นพิษสูง แต่มีปริมาณน้อยมากควรนำมาศึกษาและแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค HPLC

2. สารประกอบ 3β-acetoxy-16-hydroxyoleanan-28,13-olide และ 12-hydroxy methyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione ควรนำมาศึกษาโครงสร้างของสารประกอบด้วยเทคนิค X-ray diffraction analysis เพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสูตรโครงสร้าง

3. สารประกอบ 12-hydroxymethyl-5,5,8-trimethyl-15-oxa-tricyclo[12.2.1.0^{4,6}]heptadeca-1(17),7,10-triene-9,16-dione อาจนำมาเป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์สารใหม่เพื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่น เช่น เซลล์มะเร็งชนิด KB LE Hep-G2 H-411E และ/หรือทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ เช่น *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* *Bacillus cereus* *Pseudomonas aeruginosa*

4. การแยกสารสกัดที่เคยแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง ($ED_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$) ให้บริสุทธิ์ขึ้น เมื่อได้สารบริสุทธิ์ขึ้นแล้วพบว่ากลับมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งน้อยลง ควรดำเนินการวิจัยต่อดังนี้

4.1 นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ แต่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งน้อยลงมาผสมกันมากกว่าหนึ่งสารแล้วทดสอบกับเซลล์มะเร็งซ้ำเพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กัน

4.2 นำสารผสมที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง ($ED_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$) ไปศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเพิ่มเติม เช่น ทดสอบกับมะเร็งชนิดอื่น และ/หรือทดสอบคุณสมบัติต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน. (2530) อุทยานสมุนไพรพุทธมณฑล.

กรุงเทพฯ : ฟีนีฟับลิชชิง

กระทรวงสาธารณสุข. (2543). *สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2543*. กรุงเทพฯ : กองสถิติสาธารณสุข

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. (2544). *การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู*

(*Hedyotis corymbosa* Lamk.). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ :

บัณฑิตวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

ไซมอน การ์ดเนอร์. (2000) *ต้นไม้เมืองเหนือ(คู่มือศึกษาพรรณไม้ยืนต้นในป่าภาคเหนือ*

ประเทศไทย). กรุงเทพฯ : โครงการจัดพิมพ์คบไฟ.

ลีนา ผู้พัฒนพงศ์. (2544) *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์*. กรุงเทพฯ : ฟีนีฟับลิชชิง

พรรณา ชุมศรี. (2536). "การค้นคว้ายาใหม่จากพืชชั้นสูง," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ*.

วีณา จิรัจฉริยากุล. หน้า 346-364. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัยมหาวิทยาลัยมหิดล.

สุมิตร ทอประเสริฐ. (2536). "Principles of Chemotherapy," ใน *มะเร็งวิทยา*.

พรศรี คัดชอบ. หน้า 105-121. กรุงเทพฯ : สหมิตรเมดิเพรส

อนันต์ คงชุม. (2544). *การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้*

จาก ลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.). วิทยานิพนธ์

กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

เอมอร โสมนะพันธุ์. (2536). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์*

จากธรรมชาติ. วีณา จิรัจฉริยากุล. หน้า 202-240. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย

มหาวิทยาลัยมหิดล.

Al-Hazimi, H. M. G., Miana, G. & Deep, M. S. H. (1987). " Terpenoids from

Salvia lanifera," *Phytochemistry*. 26(4) : 1091-1093.

Anderson, M. M. et al. (1991). " In Vitro Cytotoxicity of a Series of Quassinoids from

Brucea javanica Fruits Against KB Cells," *Planta med.* 57 : 62-64.

Anjaneyulu, V. et al. (1999). " Triterpenoids from *Mangifera indica*," *Phytochemistry*.

50 : 1229-1236.

- Arisawa, M. *et al.* (1985, March-June). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, part I," *J. Nat. Prod.* 48(3) : 455-459.
- _____. (1986, March-April). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, part II," *J. Nat. Prod.* 49(2) : 298-302.
- Babu, B.H., Shylesh, B.S. & Padikkala, J. (2002). "Tumour Reducing and Anticarcinogenic Activity of *Acanthus ilicifolius* in Mice," *J. Ethnopharmacol.* 79 : 27-33.
- Babu, T.D., Kuttan, G. & Padikkala, J. (1995) "Cytotoxic and Anti-tumour Properties of Certain Taxa of Umbelliferae with Special Reference to *Centella asiatica* (L.) Urban," *J. Ethnopharmacol.* 48 : 53-57.
- Balde, A. M. *et al.* (2000). "Steroids from *Harrisonia abyssinica*," *Planta. Med.* 66(1) : 67-69.
- Banerji, A. & Das, R. (1975). "Aurantiamide & Aurantiamide acetate : New Amide from *Piper aurantiacum* Wall," *Indian J. Chem.* 13 : 1234-1236.
- Banerji, A. & Ray, R. (1981). "Aurantiamides : A New Class of Modified Dipeptides from *Piper aurantiacum*," *Phytochemistry.* 20(9) : 2217-2220.
- Camacho, M. R. *et al.* (2001). "Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*," *Phytochemistry.* 56 : 203-210.
- Chabner, B. A. & Myer, C. E. (1993). "Clinical Pharmacology of Cancer Chemotherapy," *in Cancer Principle & Practice Oncology.* Vol1 : 373-382. Philadelphia.
- Chaudhuri, *et al.* (1995). "Isolation and Structural Elucidation of Pentacyclic Triterpenoids from *Maprounea africana*," *J. Nat. Prod.* 58(1) : 1-9.
- Das, B. & Srinivas, K. V. N. S. (1992). "Minor C₂₉-steroids from the Marine Red Alga, *Gracilaria edulis*," *Phytochemistry.* 31(7) : 2427-2429.
- Fernandez, M. I. *et al.* (1983) "Constituent of a Hexane Extract of *Phoenix dactylifera*," *Phytochemistry.* 22(9) : 2087-2088.
- Fiebig, M. *et al.* (1985, November-December). "Plant Anticancer Agents, XLI. Cardiac Glycosides from *Streblus asper*," *J. Nat. Prod.* 48(6) : 981-985.
- Fujita, A. *et al.* (1988, July-August). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, part III," *J. Nat. Prod.* 51(4) : 708-712.

- Fukamiya, N. *et al.* (1992, April). "Antitumor Agents, 127. Bruceoside C, a New Cytotoxic Quassinoid Glucoside, and Related Compounds from *Brucea javanica*," *J. Nat. Prod.* 55(4) : 468- 475.
- Gaspar, E. M. M. & Das Nevers H. J. C. (1993). "Steroidal Constituents from Mature Wheat Straw," *Phytochemistry*. 34(2) : 523-527.
- Greca, M. D. Monoco, P. & Previtera, L. (1990). "Stigmasterols from *Typha latifolia*," *J. Nat. Prod.* 53(6) :1430-1435.
- Guo, S. *et al.* (2000). "Triterpenoid Saponins Containing an Acetylated Branched D-fucosyl Residue from *Quillaja saponaria* Molina," *Phytochemistry*. 53 : 861-868.
- Herz, W., Bhat, S.V. & Santhanam. (1970). "Coumarins of *Artemisia dracunculoides* and 3',6-dimethoxy-4',5,7-trihydroxyflavone in *A. arctica*," *Phytochemistry*. 9 : 891-894.
- Huang, P. L., Wang, L. W. & Lin, C. E. (1999). "New Triterpenoids of *Mallotus repandus*," *J. Nat. Prod.* 62(6) : 891-892.
- Hui, W. H. & Li, M. M. (1976). "Two New Triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*," *Phytochemistry*. 15 : 1741-1743.
- Ishiguro, K. *et al.* (1991). "Adipeptide Derivative from *Hypericum japonicum*," *Phytochemistry*. 30(11) : 3639-3641.
- Jones, S. R. & Selinsky, B. S. (1998). "Efficient Route to 7 α -(Benzoyloxy)-3-dioxolane Cholestan-24-(R)-ol, a Key Intermediate in the Synthesis of Squalamine," *J. Org. Chem.* 63(11) : 3786-3789.
- Jork, H. *et al.* (1990). *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods* Vol. 1a Germany : VCH-Verlag, Weinheim.
- Katai, M. Terai, T. & Meguri, H. (1983). "Triterpenoids of the Bark of *Pieris japonica* D.Don (Japsnese Name : Asibi). II. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance of the γ -Lactones of Ursane- and Oleanane-type Triterpenes," *Chem. Pharm. Bull.* 31(5) : 1567-1571.

- Katsui, N. *et al.* (1972). "Phytosterols and Triterpenes in the Roots of the "Kidney Bean" (*Phaseolus vulgaris* L.)," *B. Chem. Soc. Jpn.* 45(1) : 223-226.
- Kayser, O. & Kolodziej. (1997). "Antibacterial Activity of Extracts and Constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*," *Plant. Med.* 63 : 508-510.
- Keawpradub, N. *et al.* (1997). "Activity of Extracts and Alkaloids of Thai *Alstonia* species Against Human Lung Cancer Cell Lines," *Planta Med.* 63 : 97-101.
- Lu, H. *et al.* (1999). "Bioactive Constituents from *Peteris multifida*," *Planta Med.* 65 : 586-587.
- Ministry of Public Health. (2003). *Cancer in Thailand Vol. 3*. Bangkok : Bangkok Medical Publisher.
- Misra, M. P. & Khastgir, H. N. (1970) "Terpenoids and Related Compounds-XI Chemical Investigation of *Aleurites montana* and the Structure of Aleuritolic acid-a New Triterpene Acid," *Tetrahedron*. 26 : 3017-3021.
- Monaco, P. & Previtera, L. (1991). "A Steroid from *Pistia stratiotes*," *Phytochemistry*. 37 : 2420-2422.
- Ohnishi, S. *et al.* (1995, July). "Bruceosides D, E and F Tree New Cytotoxic Quassinoid Glucodides from *Brucea javanica*," *J. Nat. Prod.* 58(7) : 1032-1038.
- Peres, M. T. *et al.* (1997). "A Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae)," *J. Ethnopharmacol.* 56(3) : 223-226.
- Pornsiriprasert, D. (1986). *Study on Anticancer Activity of Medicinal Plant Extract of a Well-Known Thai Folkloric Remedy*. Thesis M.Sc (Pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopies.
- Poucher, J. C. & Behke, J. (1993). *The aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra* Vol.3 Winconsin : Aldrich Chemical.
- Pradhan, B. P., Chakraborty, D. K. & Subba, G. C. (1990). "A Triterpenoid Lactone from *Leucas aspera*," *Phytochemistry*. 29(5) : 1693-1695.
- Razdan, T. K. *et al.* (1987). "Chromenes and Coumarins from *Skimmia laureola*," *Phytochemistry*. 26(7) : 2063-2069.
- Schroeder, G. *et al.* (1980). "7-oxo-7-hydroxy and 7-hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*," *Phytochemistry*. 19 : 2213-2215.

- Seo, Y. *et al.* (2002). " Bioactive Saponins from *Acacia tenuifolia* from the Suriname Rainforest," *J. Nat. Prod.* 65(2) : 170-174.S
- Shafizadeh, F. & Melnikoff, A. B. (1970). " Coumarins of *Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana*," *Phytochemistry.* 9 : 1311-1316.
- Sibanda, S. *et al.* (1989). " A Coumarin Glucoside from *Xeromphis obovata*," *Phytochemistry.* 28(5) : 1550-1552.
- Siddiqui, S. *et al.* (1986, November-December). " Kaneric Acid, a New Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*," *J. Nat. Prod.* 49(6) : 1086-1090.
- Silvan, A. M. *et al.* (1996). " Antiinflammatory Activity of Coumarins from *Santolina bolongtfolia*," *J. Nat. Prod.* 59(12) : 1183-1185.
- Song, S. J. *et al.* (2001). " Five Saponins from the Root Bark of *Aralia elata*." *Phytochemistry.* 56 : 491-497.
- Sutthivaiyakit, S. *et al.* (2001). " D:A Friedo-oleanane Lactones from the Stems of *Mallotus repandus*," *J. Nat. Prod.* 64(5) : 569-571.
- Talapatra, S. K. *et al.* (1985). " On the Chemistry of Indian Orchedacea Plants-II," *Tetrahedron.* 41(13) : 2765-2769.
- Talapatra, S. Mallik, A. K. & Talapatra, B. (1980). " Pongalabol, a New Hydroxyfuranoflavone, and Aurantoamide acetate, a dipeptide from the Flowers of *Pongamia glabra*," *Phytochemistry.* 19 : 1192-1202.
- Tsai, P. L. *et al.* (1998). " Constituents and Bioactive Principles of *Polygonum chinensis*," *Phytochemistry.* 49(6) : 1663-1666.
- Wahidulla, S. D'Souza, L. & Kamat, S. Y. (1991). " Dipeptides from the Red Alga *Acantophora sptcirera*," *Phytochemistry.* 30(10) : 3323-3325.
- Wall, E. M., Wani, M.C. & Tayler, H. (1976). " Isolation and Chemical Characterization of Antitumour Agent from Plants," *Cancer Treat. Rep.* 60(8) : 1011-1030.
- Webber, N. (1977). " 3-Hetosteroide in Soja-Suspensionskultaren," *Phytochemistry.* 16 : 1849-1851.
- Wong, S. M. *et al.* (1986, March-April). " Isolation and Characterization of a New Triterpene from *Iris missouriensis*," *J. Nat. prod.* 49(2) : 330-333.

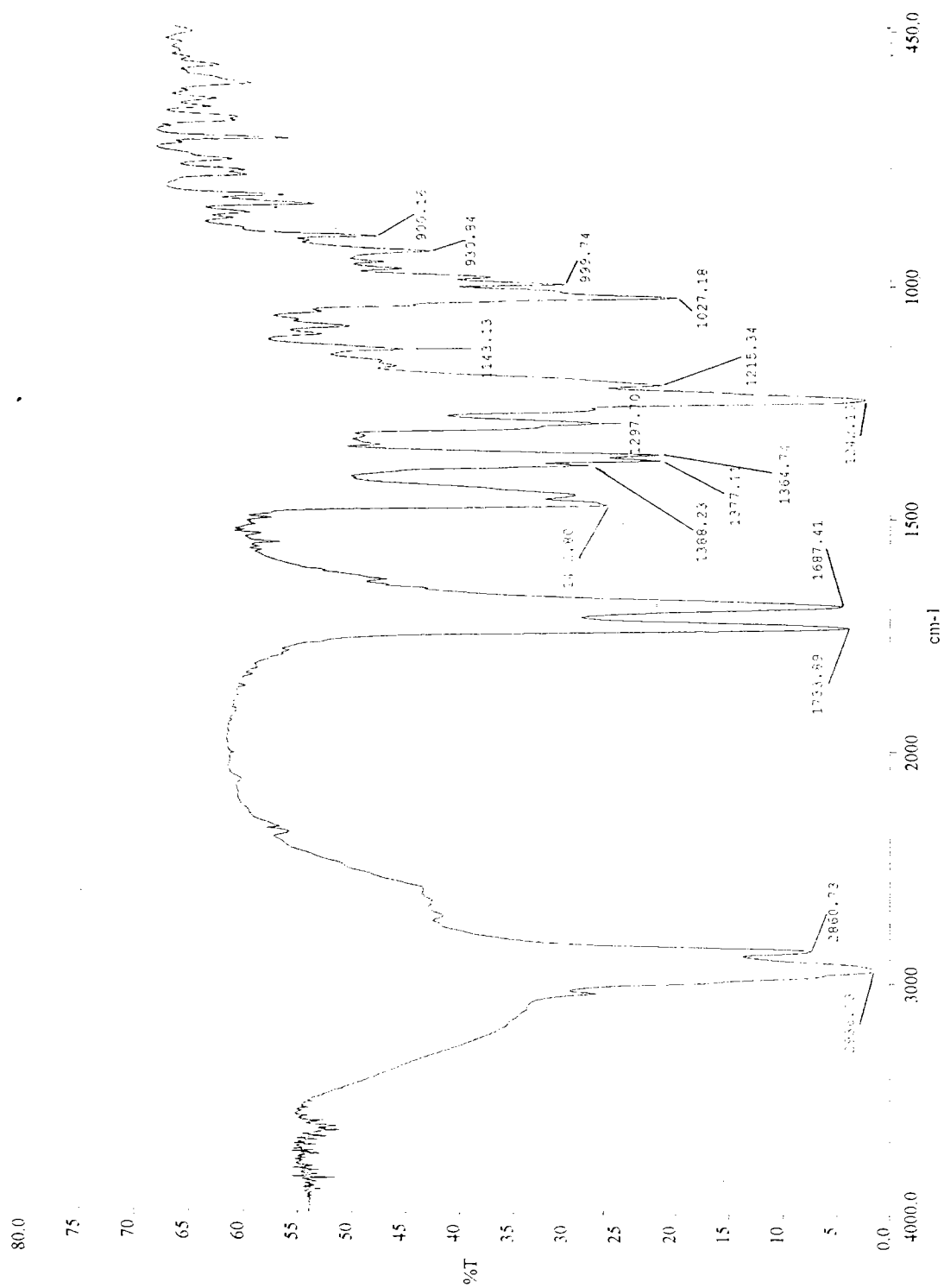
- Woo, W. S. & Wagner, H. (1977). " 3-Acetylleurotic acid from the Seeds of *Phytolacca americana*," *Phytochemistry*. 16 : 1845-1846.
- Wu, T. S. *et al.* (1998). " Rhinacanthin-Q a Naphthoquinone from *Rhinacanthus nasutus* and Its Biological activity," *Phytochemistry*. 49(7) : 2001-2003.
- Zhang, Z. *et al.* (1999). " Triterpenoidal Saponins from *Gleditsia sinensis*," *Phytochemistry*. 52 : 715-722.

ภาคผนวก

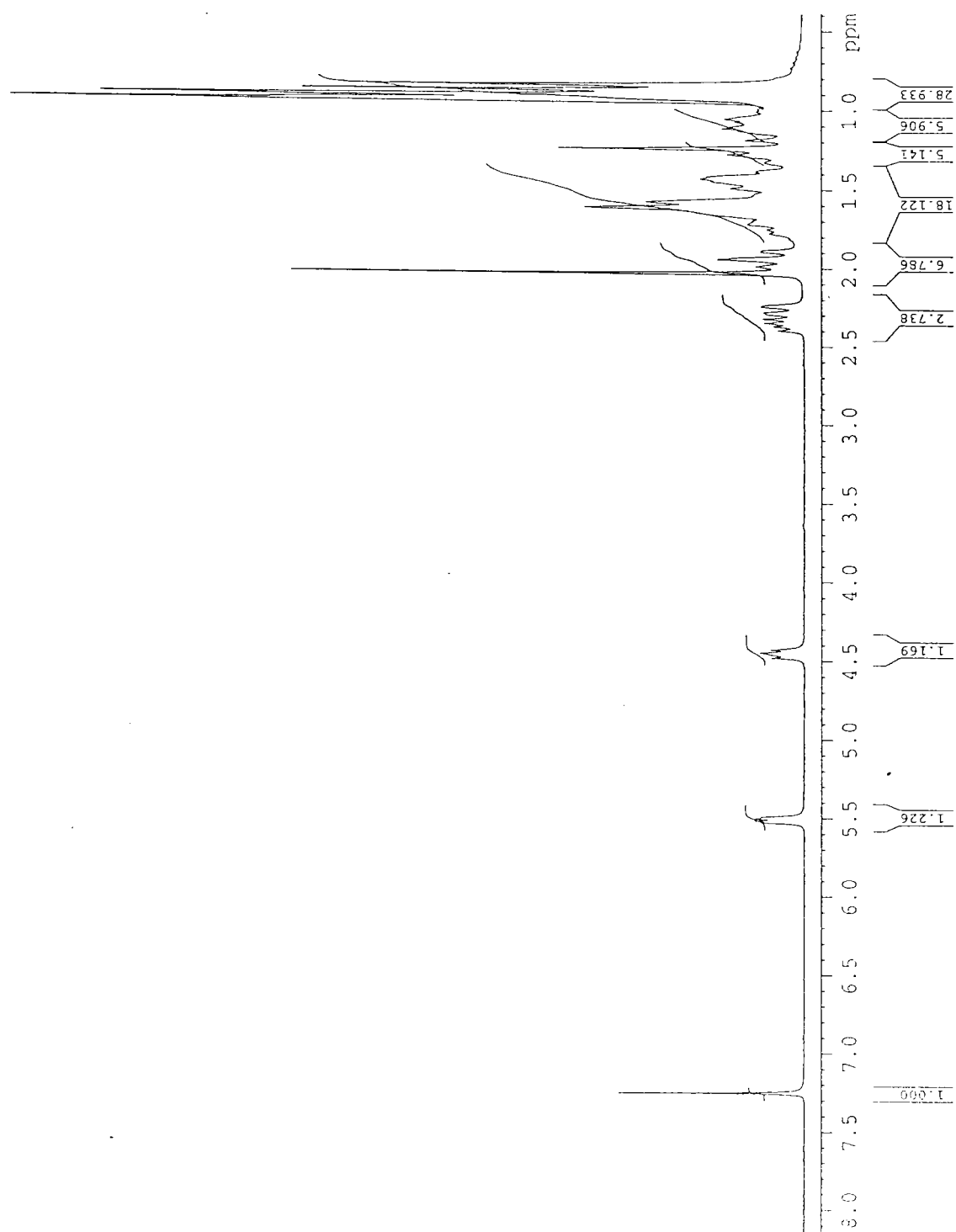
ภาคผนวก ก

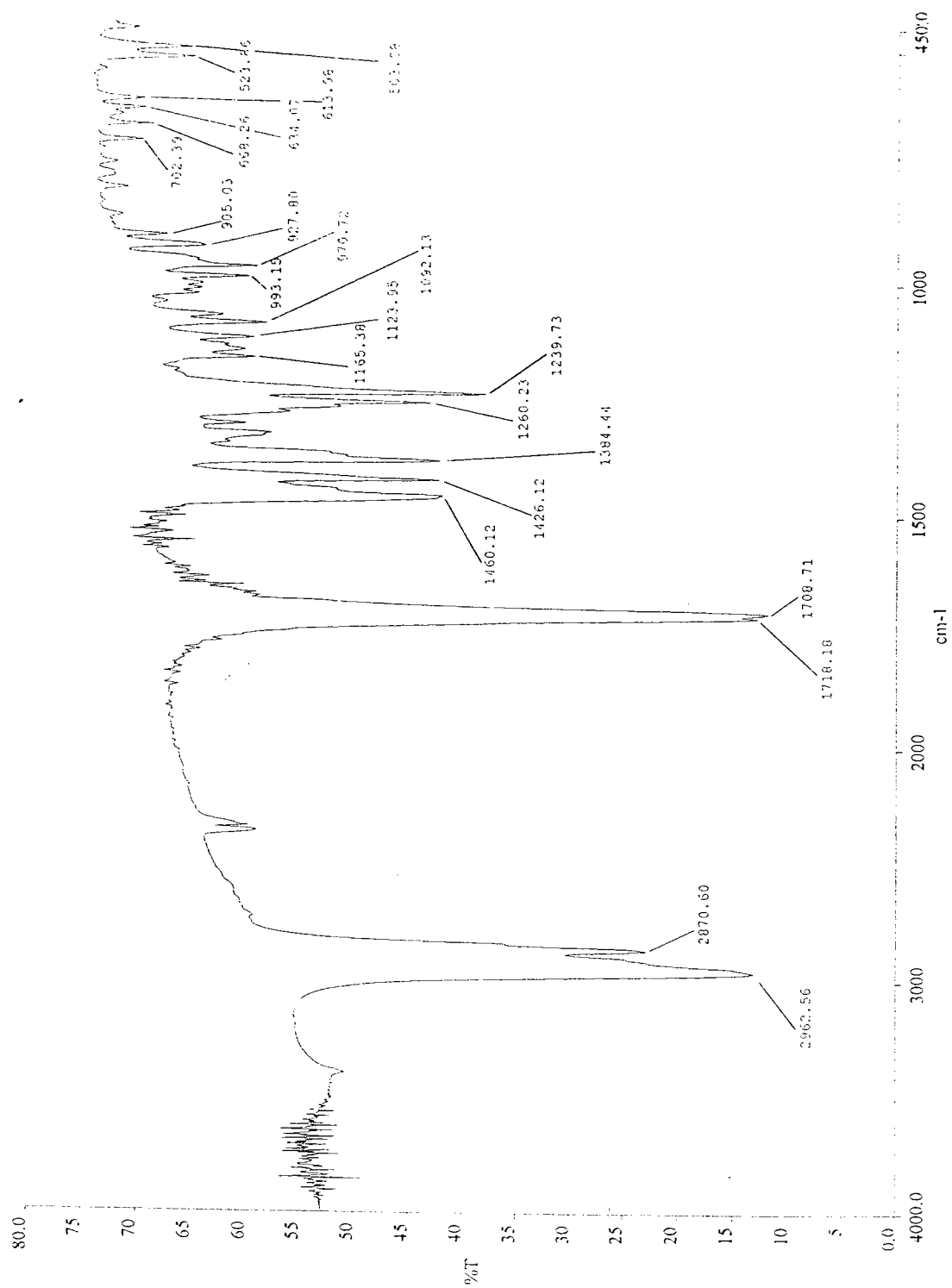
สเปกตรัมของสารประกอบที่แยกได้จากต้นหลอดเถื่อน

ในสารสกัด hexane และ CH_2Cl_2

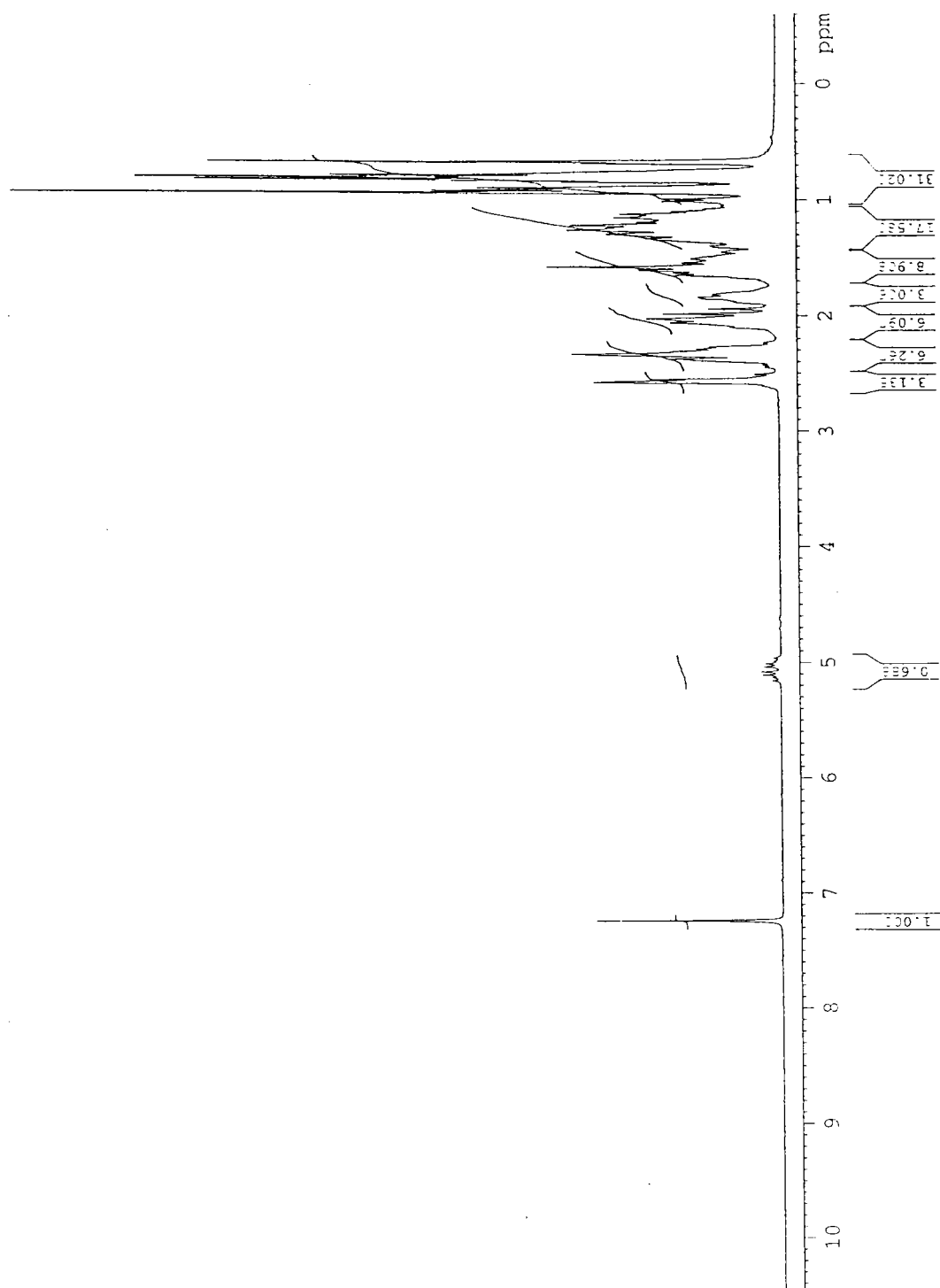


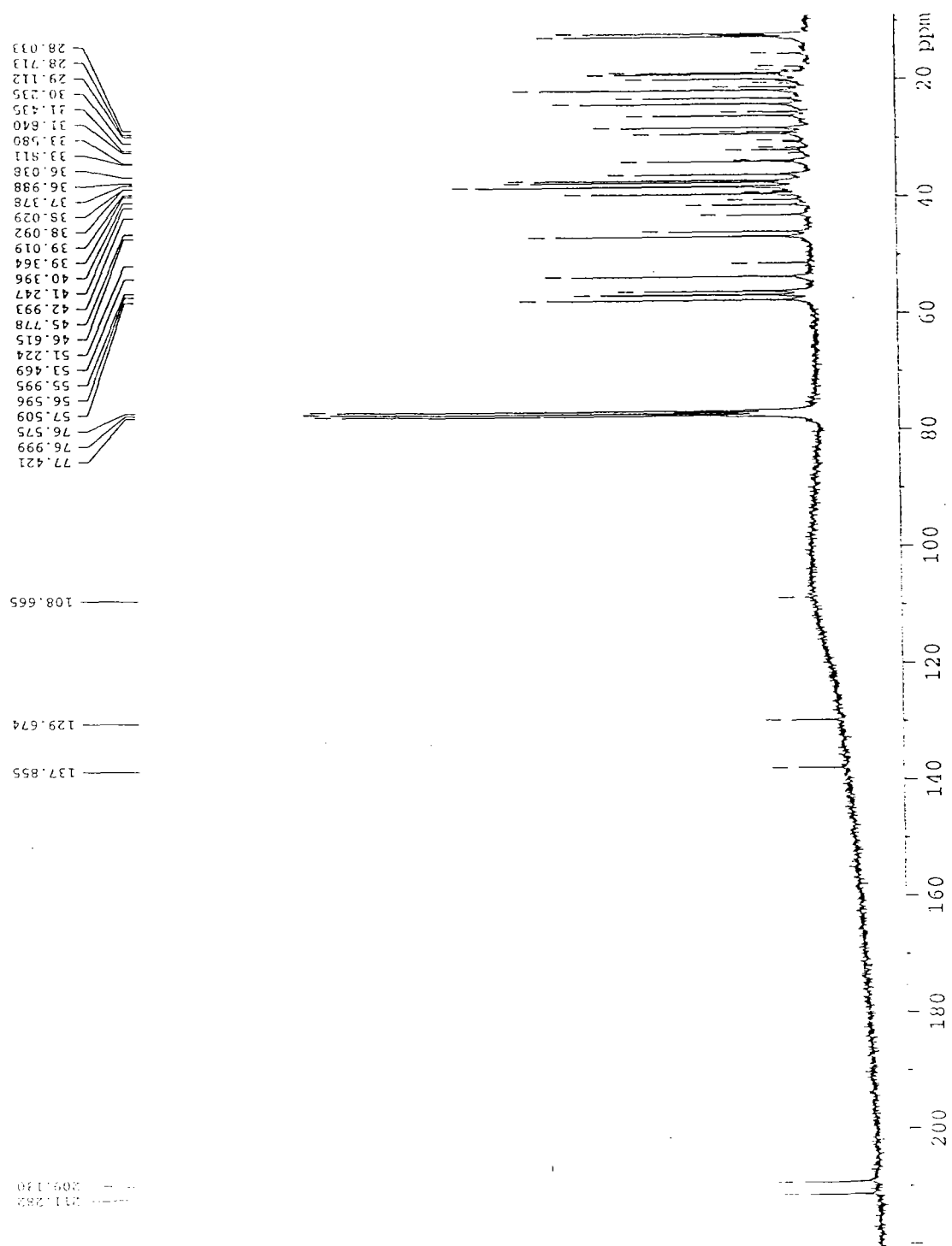
ภาพประกอบ 53 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ A

ภาพประกอบ 54 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ A



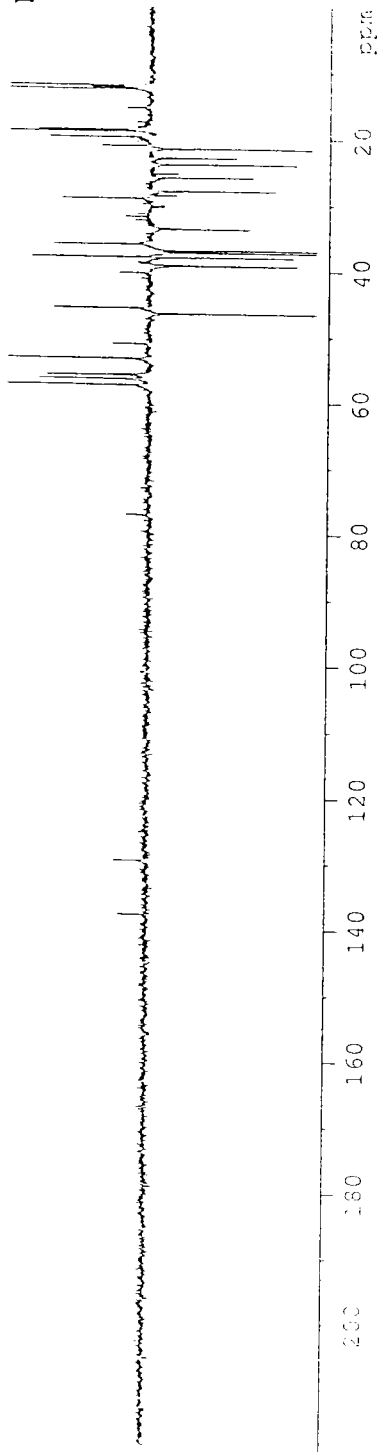
ภาพประกอบ 55 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ B

ภาพประกอบ 56 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ B

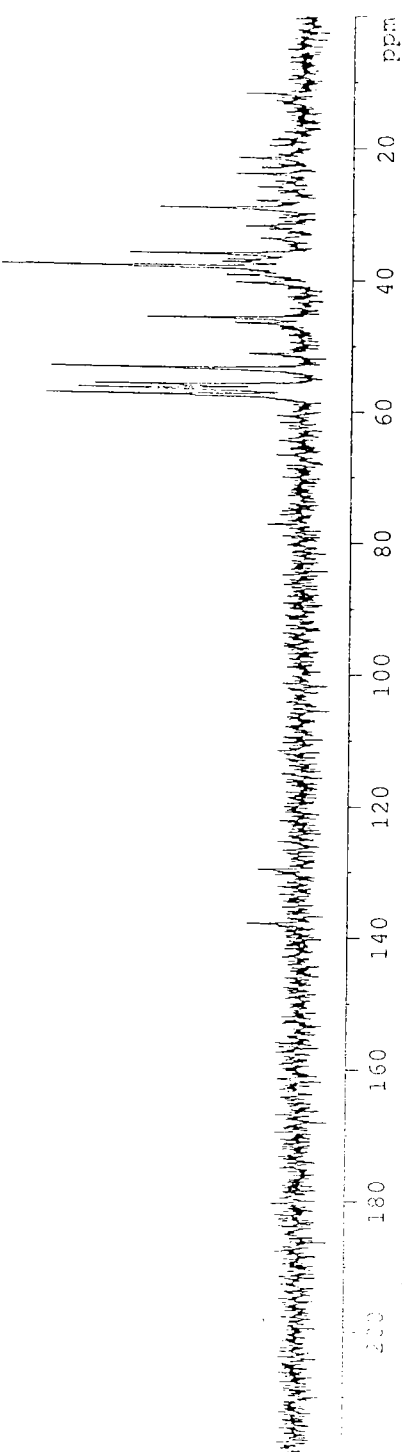


ภาพประกอบ 57 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ B

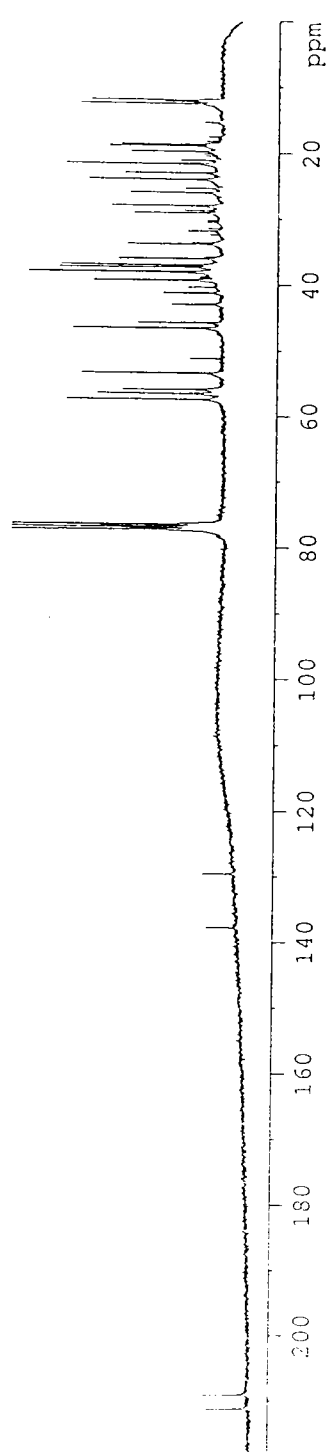
DEPT135



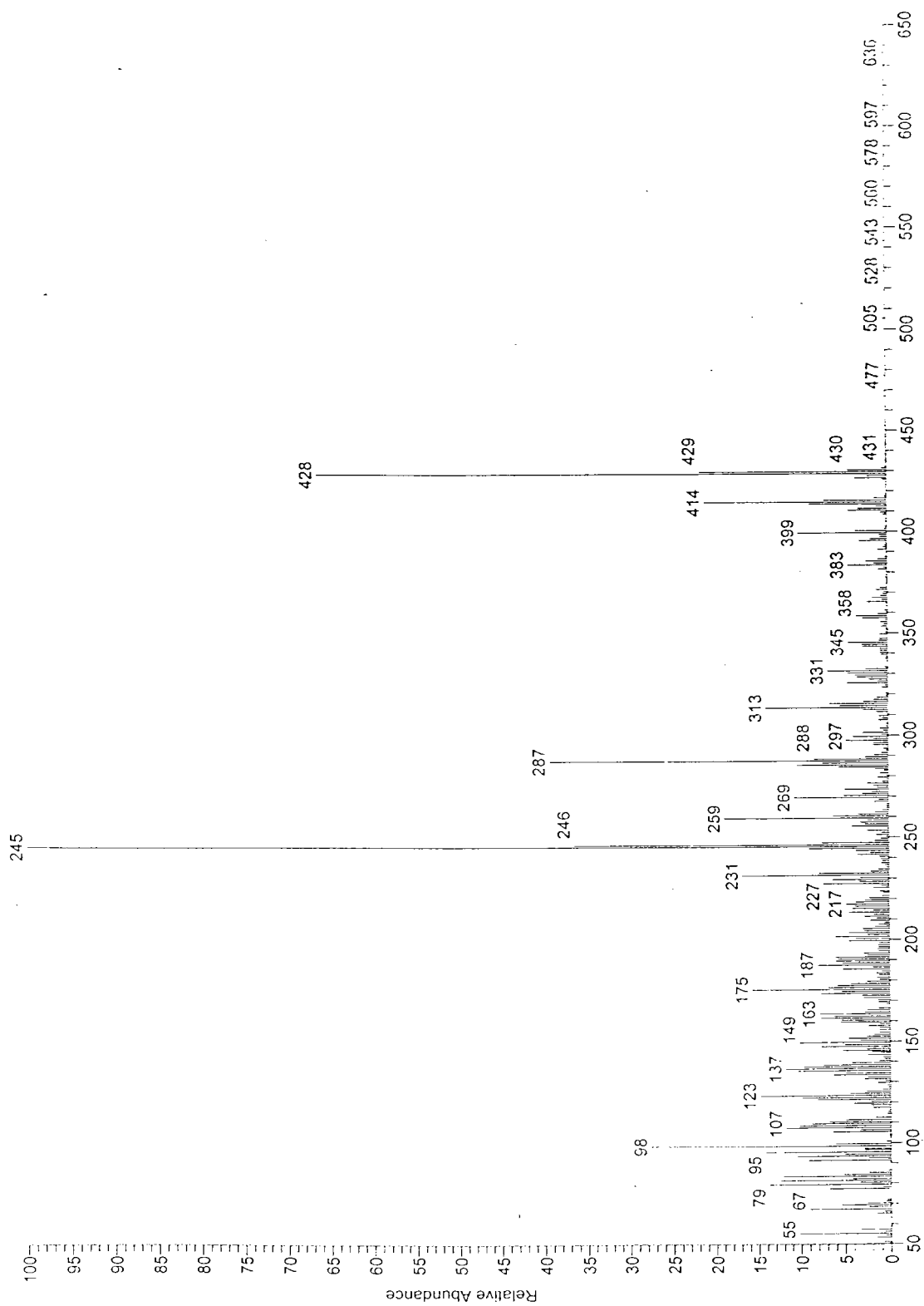
DEPT90



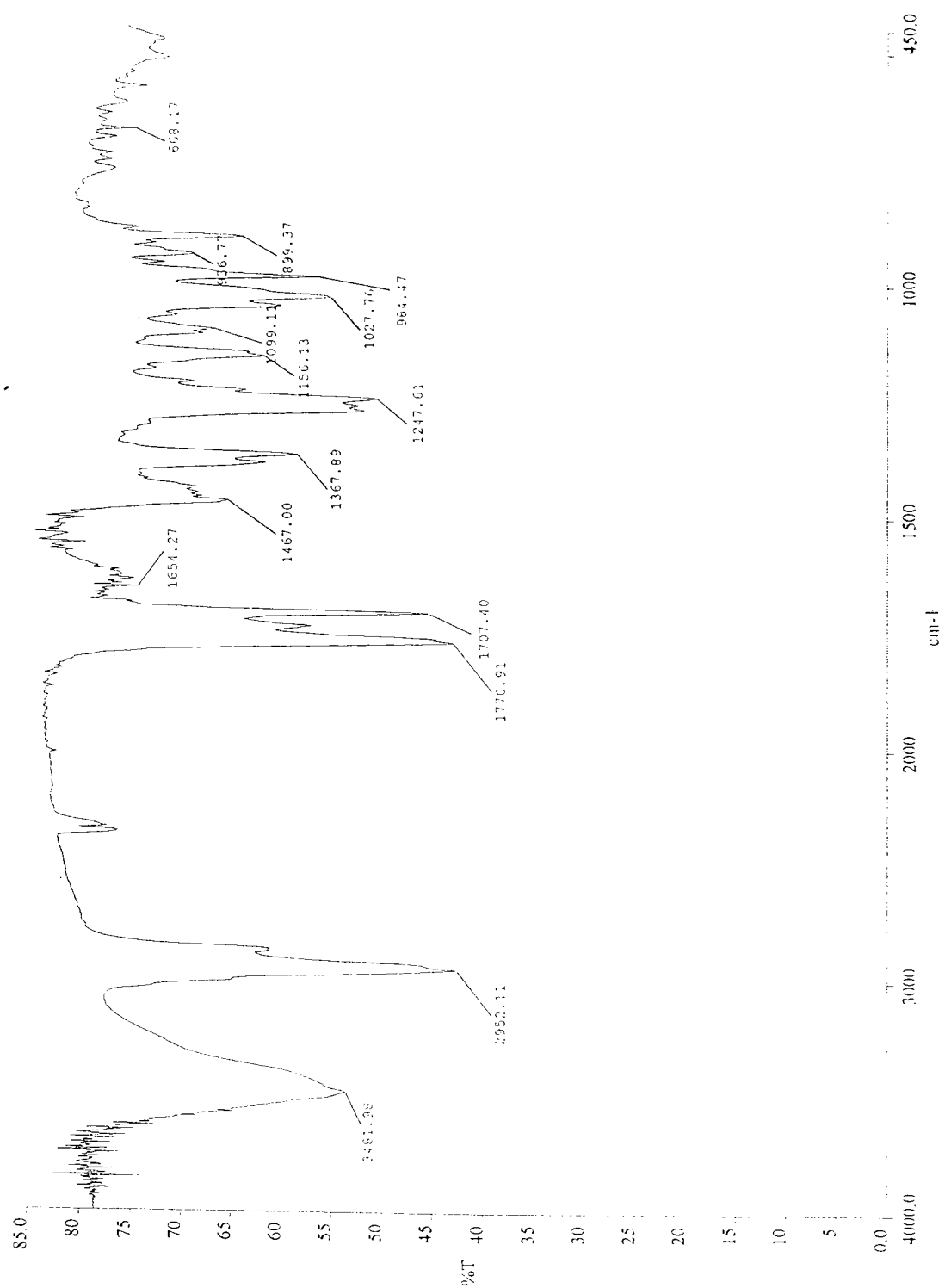
¹³C



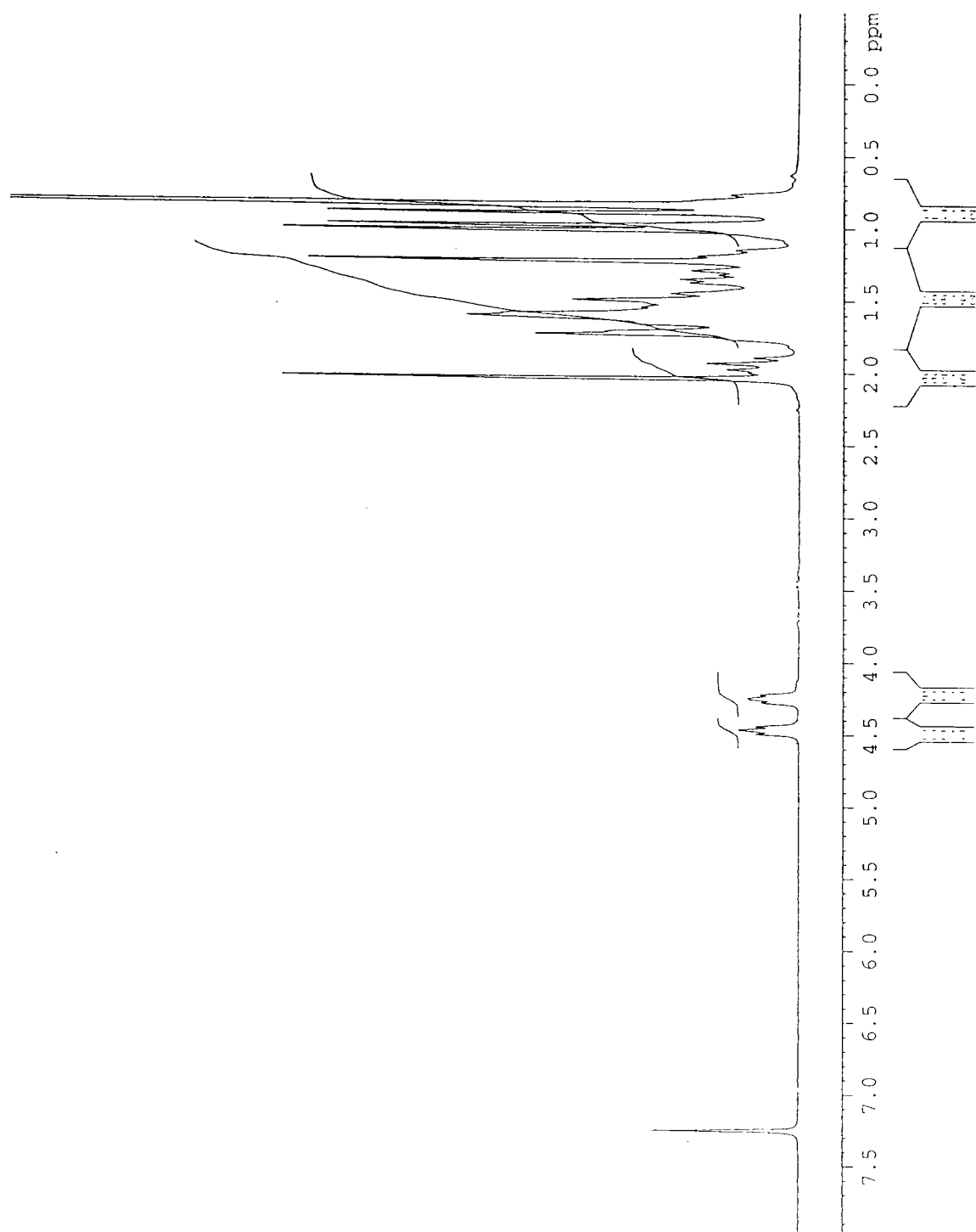
ภาพประกอบ 58 ¹³C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B



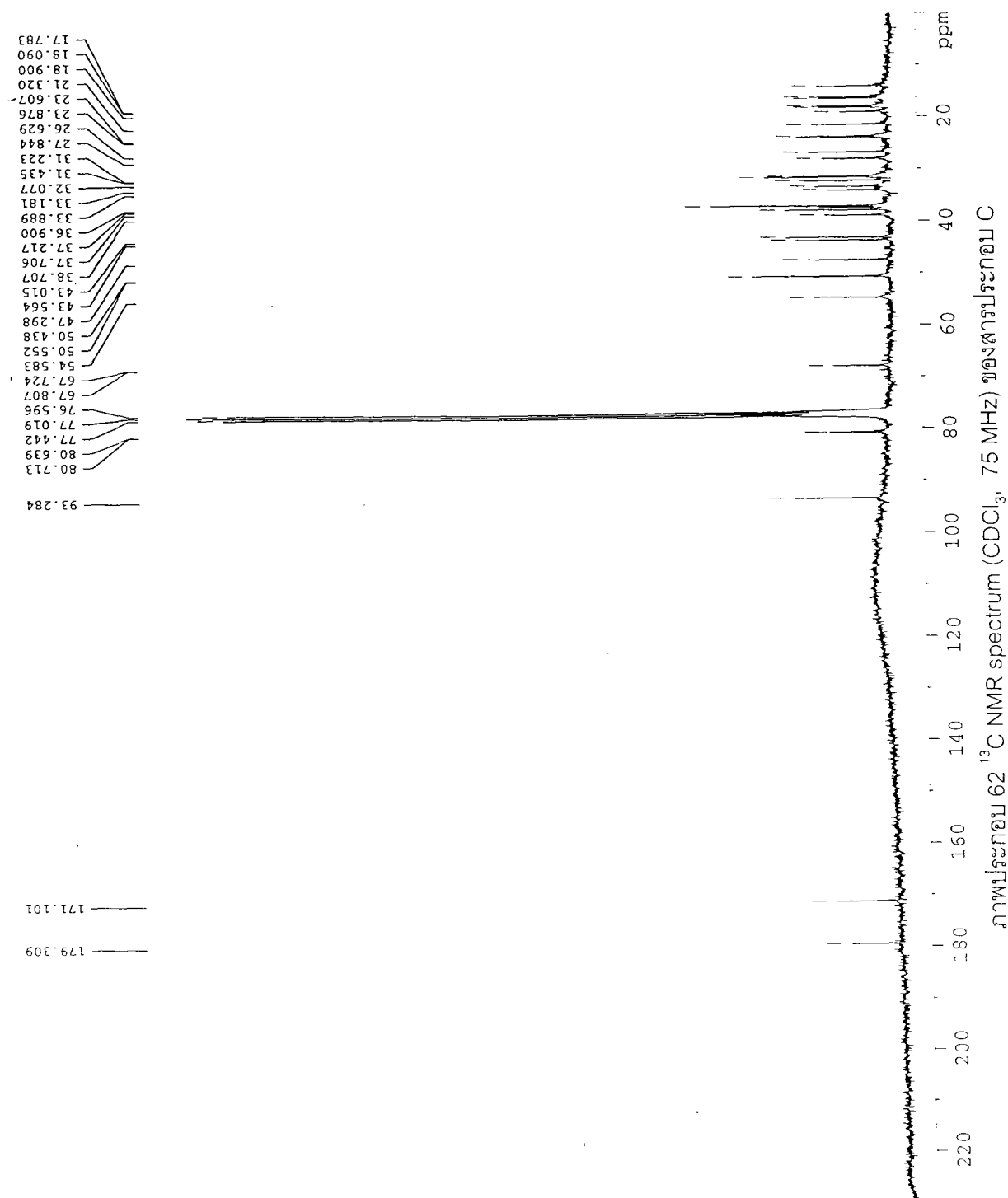
ภาพประกอบ 59 Mass spectrum ของสารประกอบ B

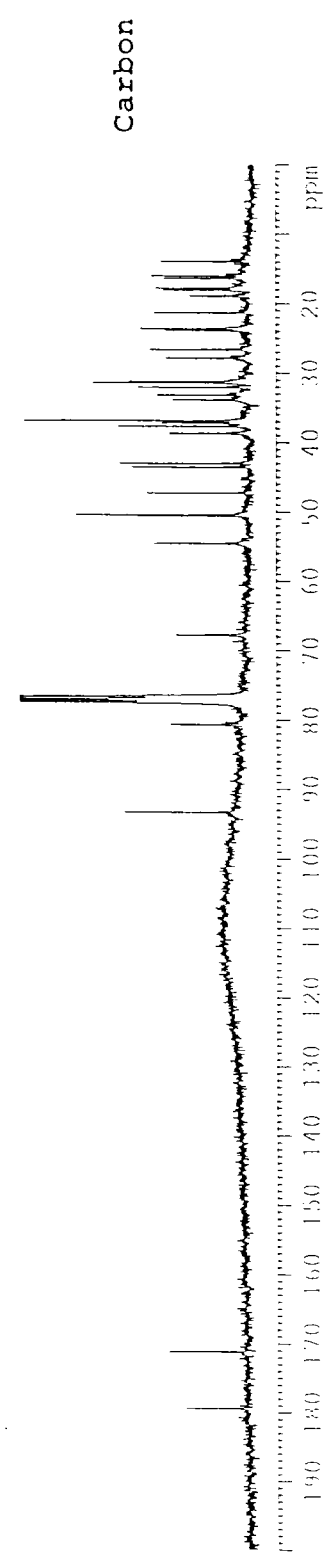
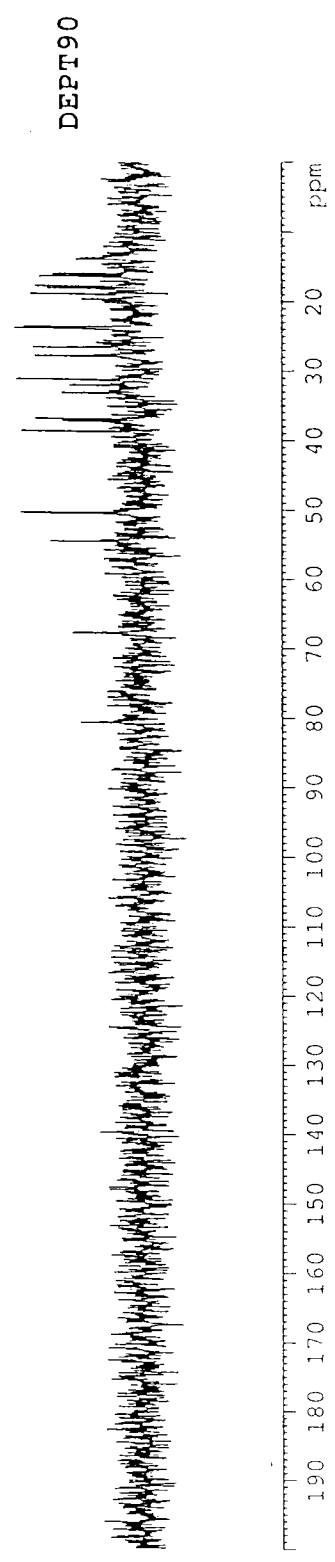
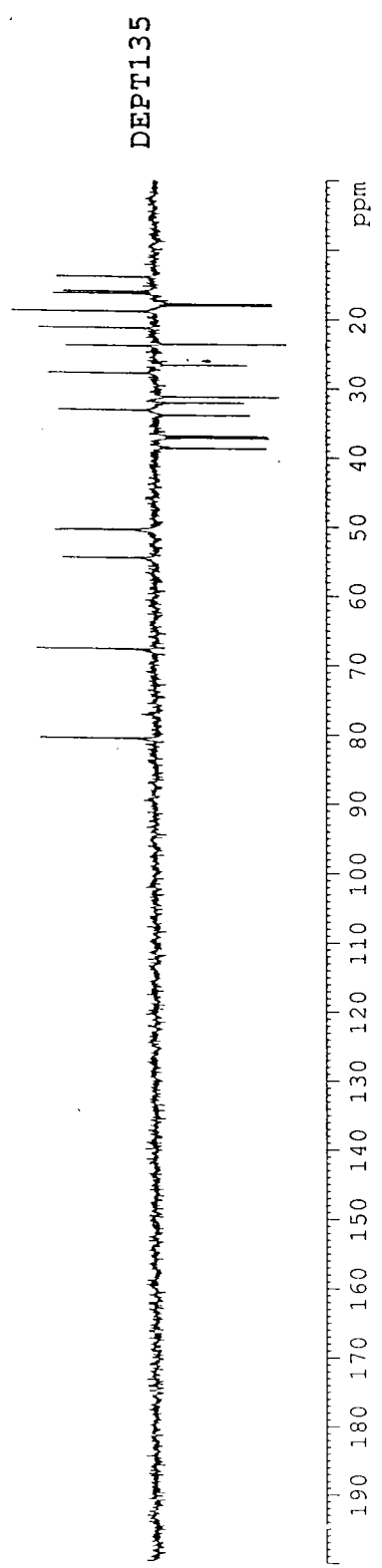


ภาพประกอบ 60 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ C

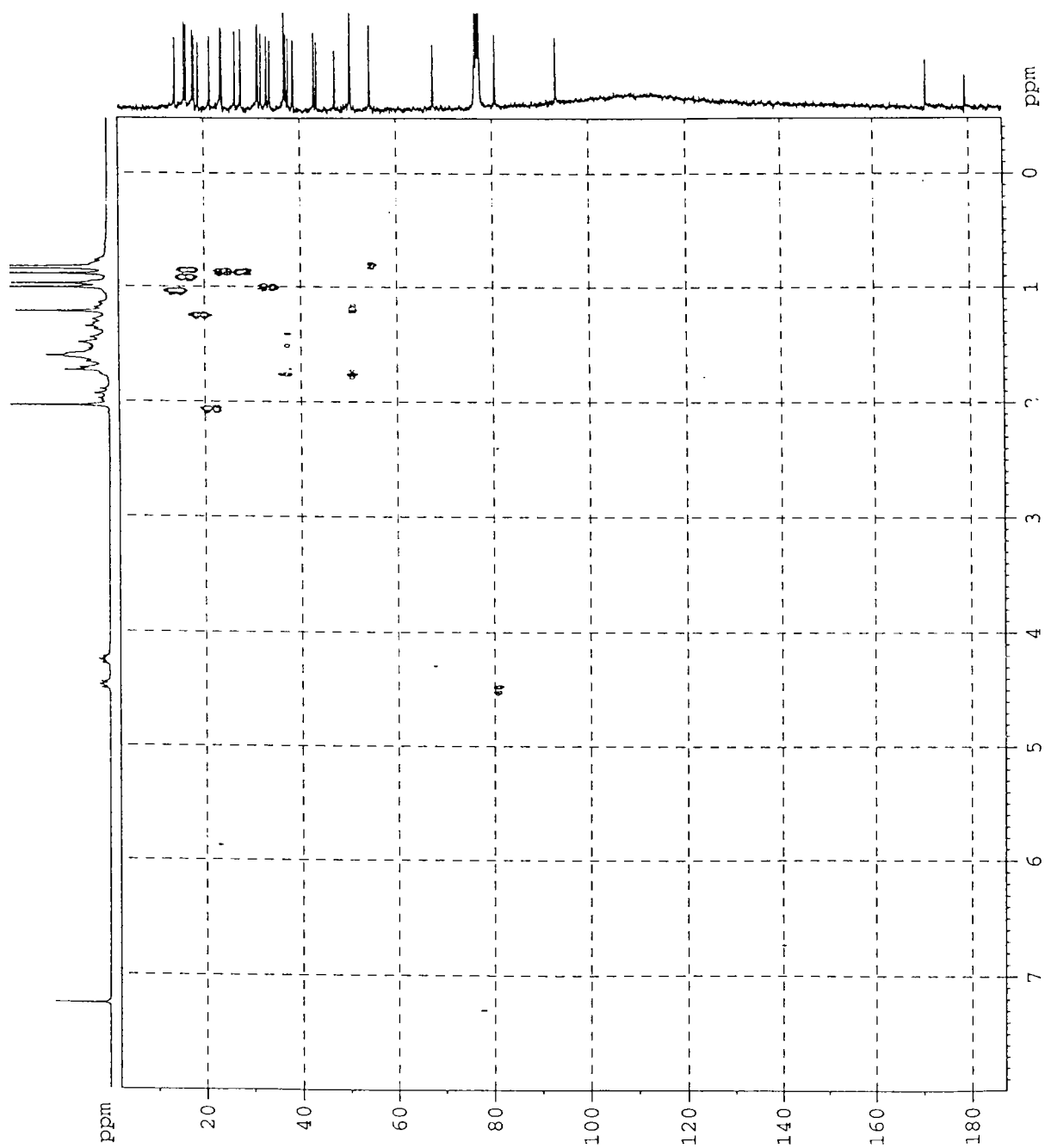


ภาพประกอบ 61 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ C

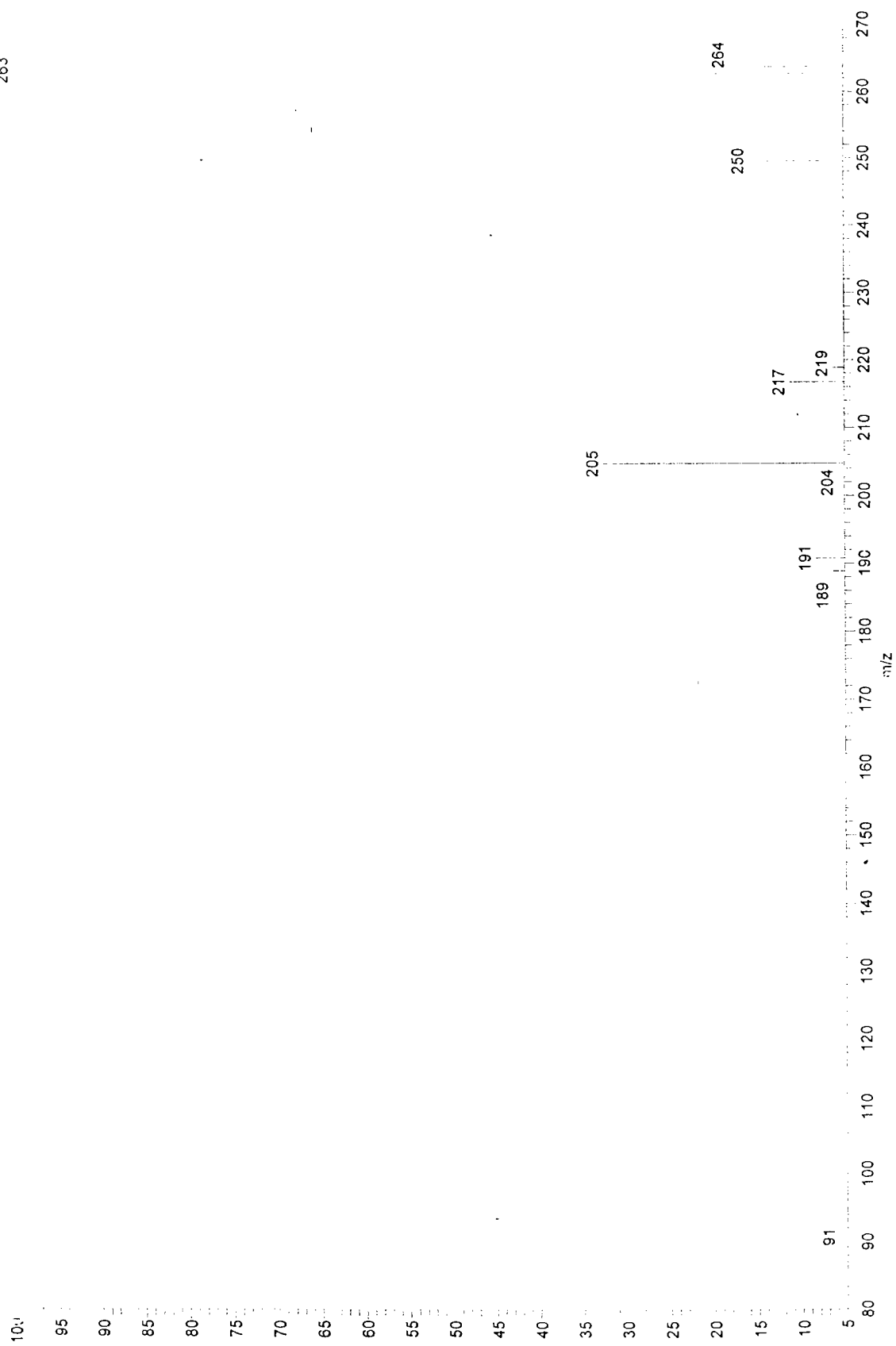




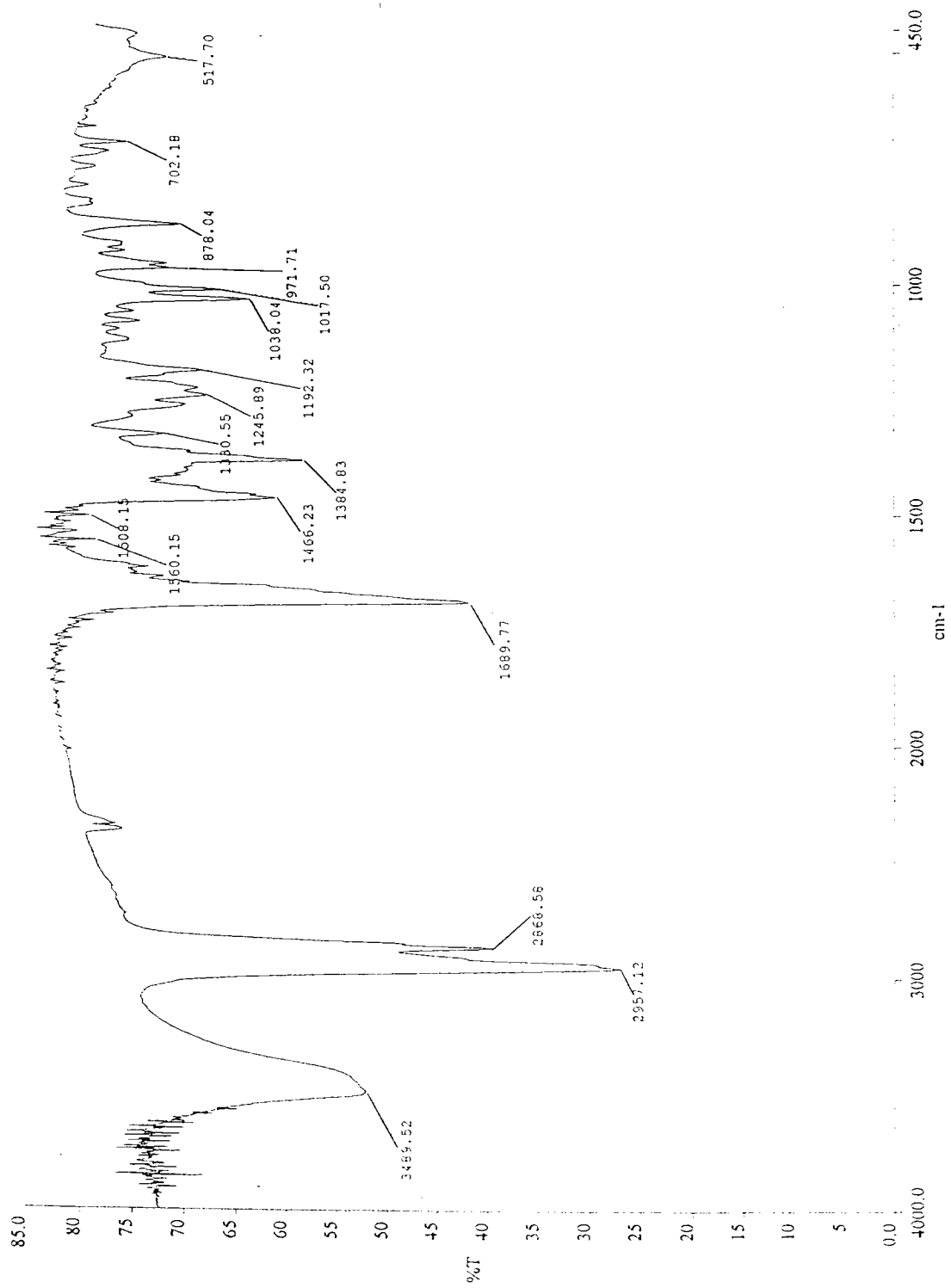
ภาพประกอบ 63 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ C



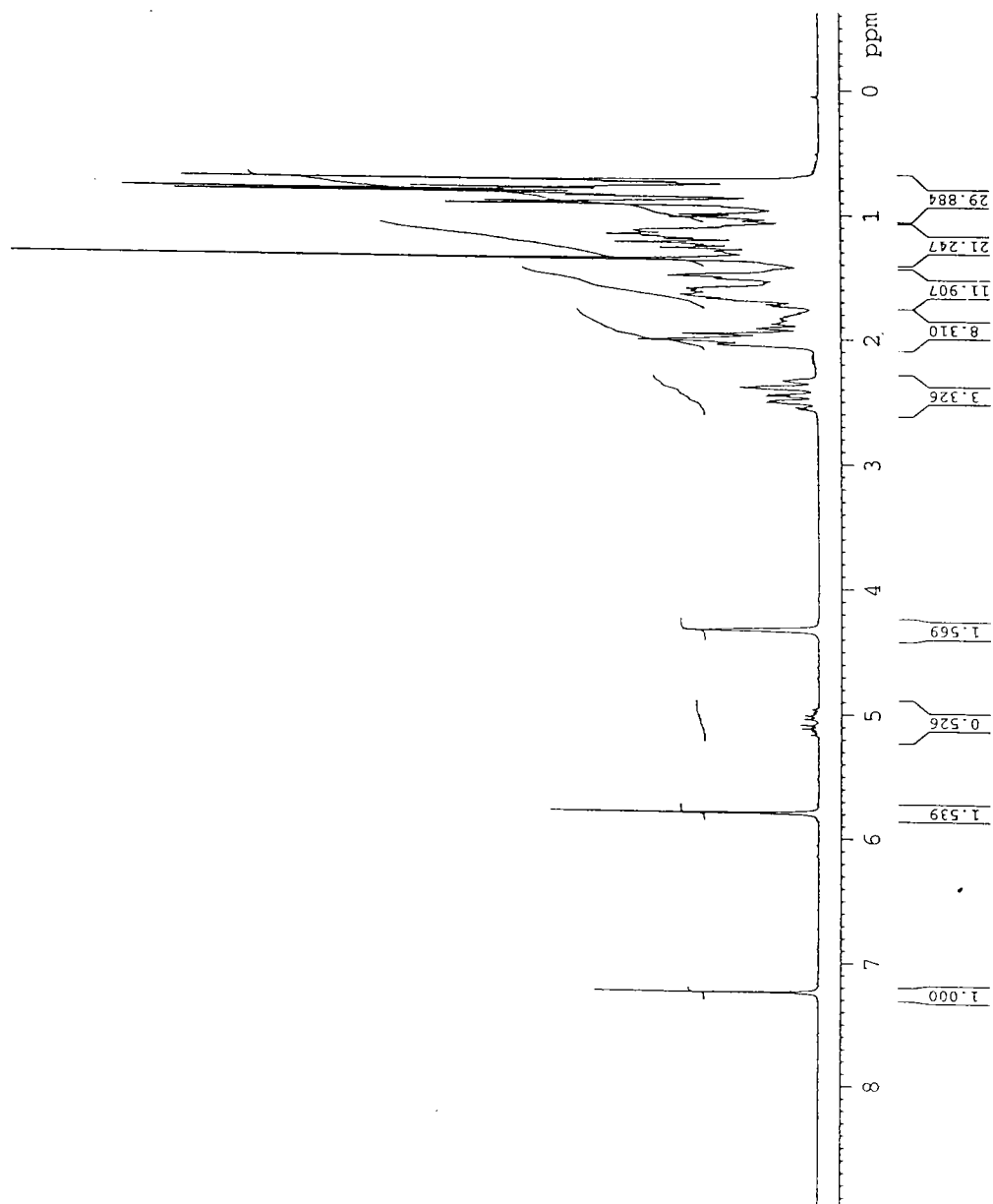
ภาพประกอบ 64 HMQC spectrum ของสารประกอบ C

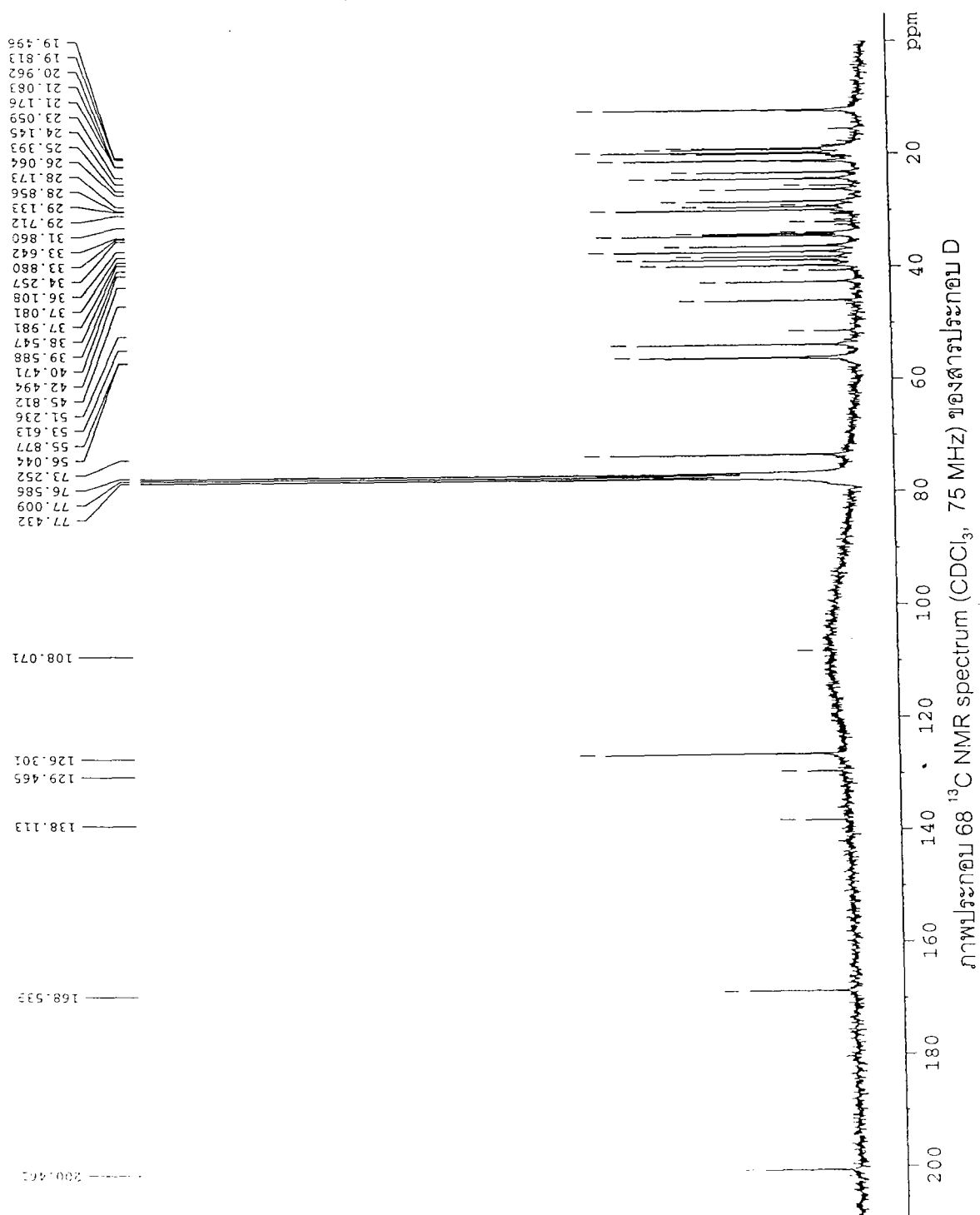


ภาพประกอบ 65 Mass spectrum ของสารประกอบ B

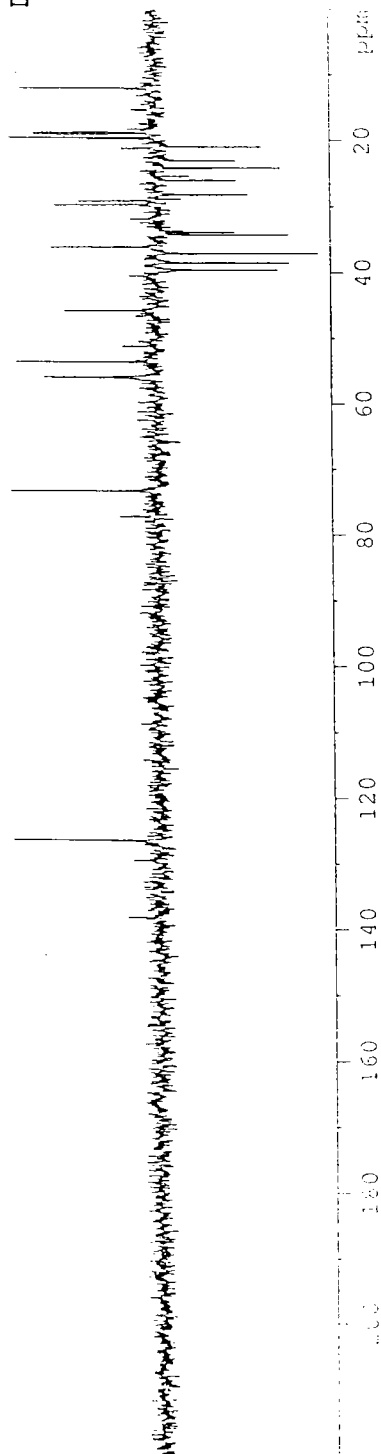


ภาพประกอบ 66 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ D

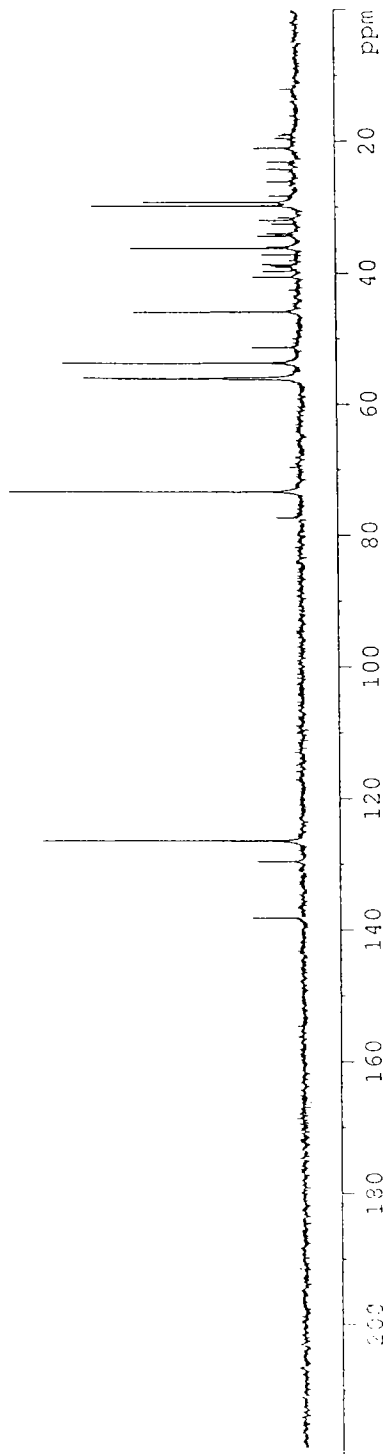
ภาพประกอบ 67 ^1H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ D



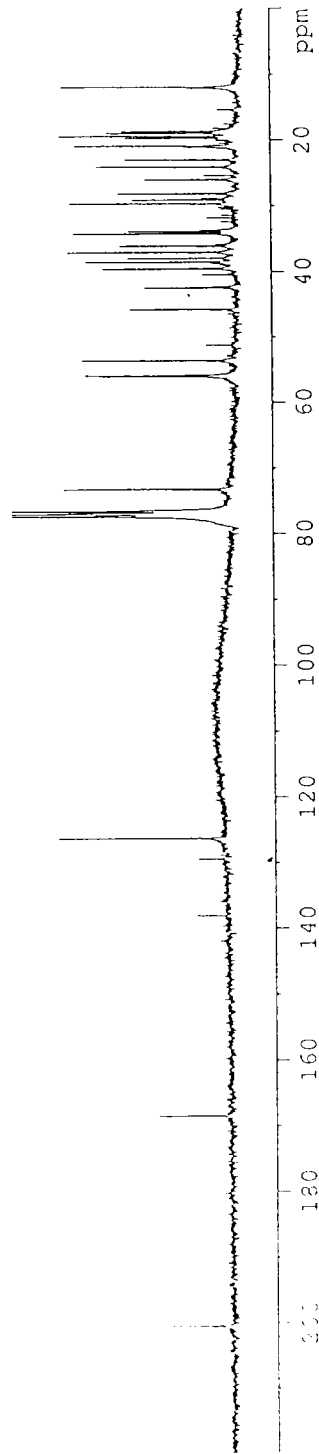
DEPT135



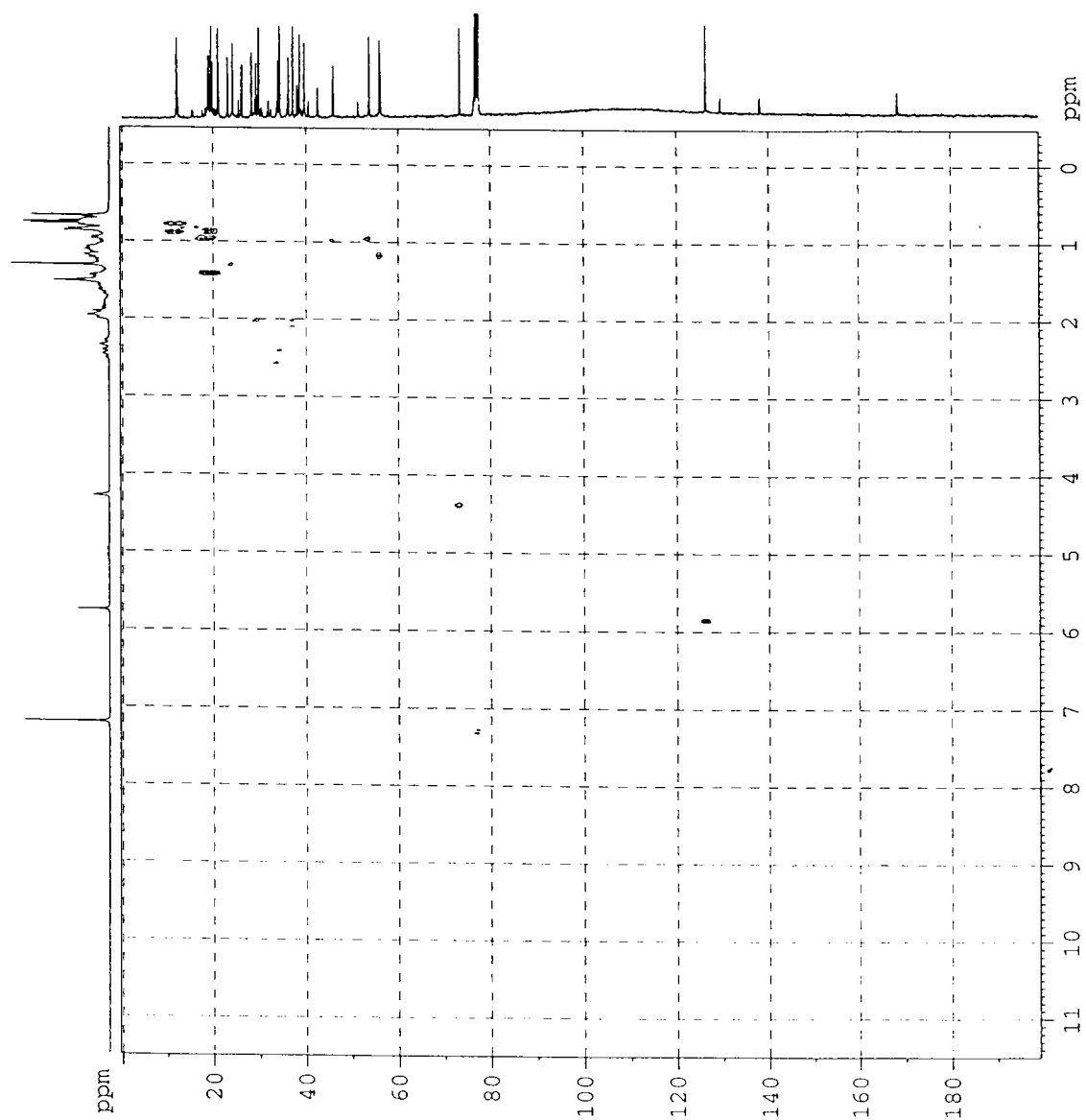
DEPT90



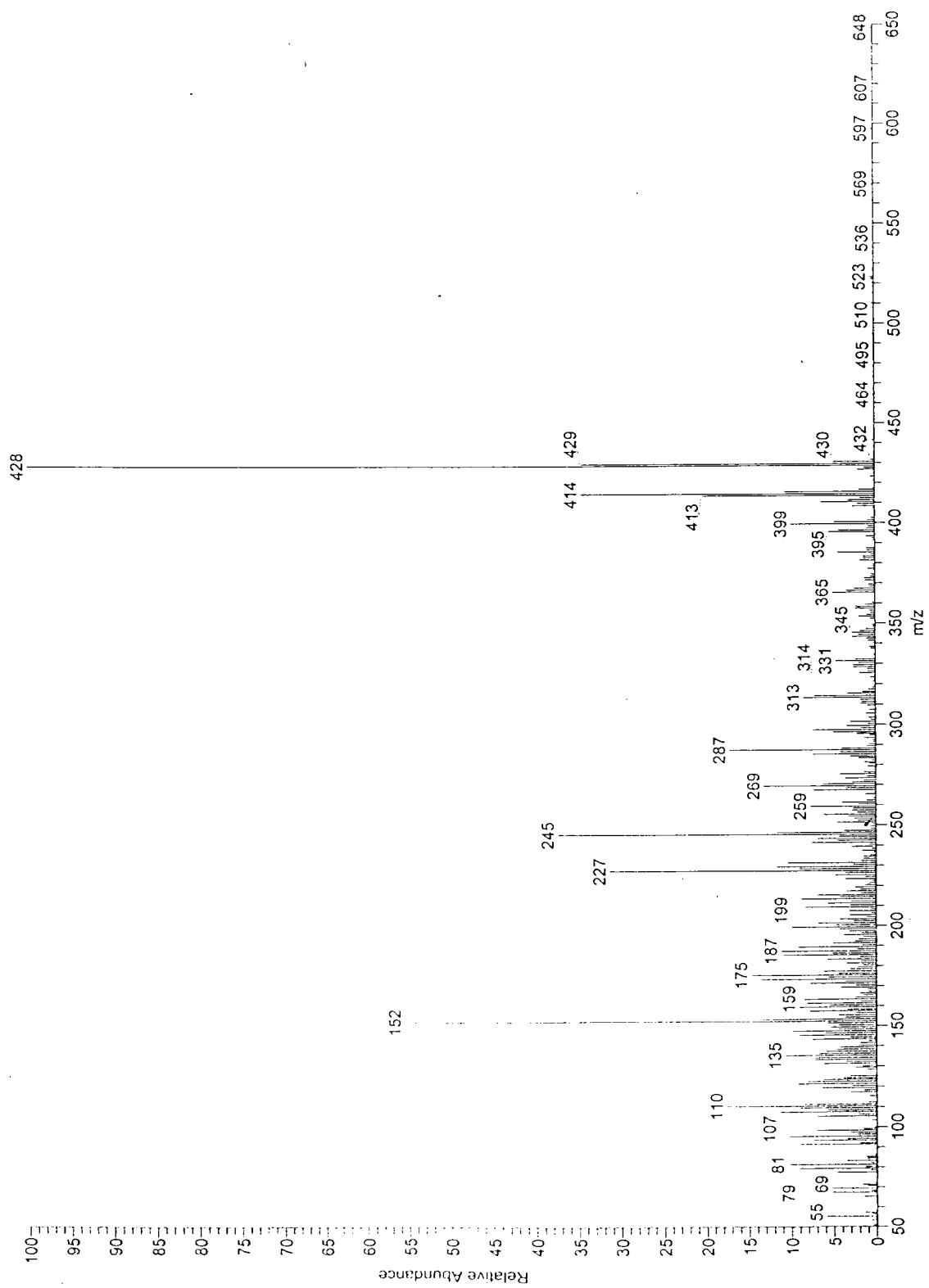
¹³C



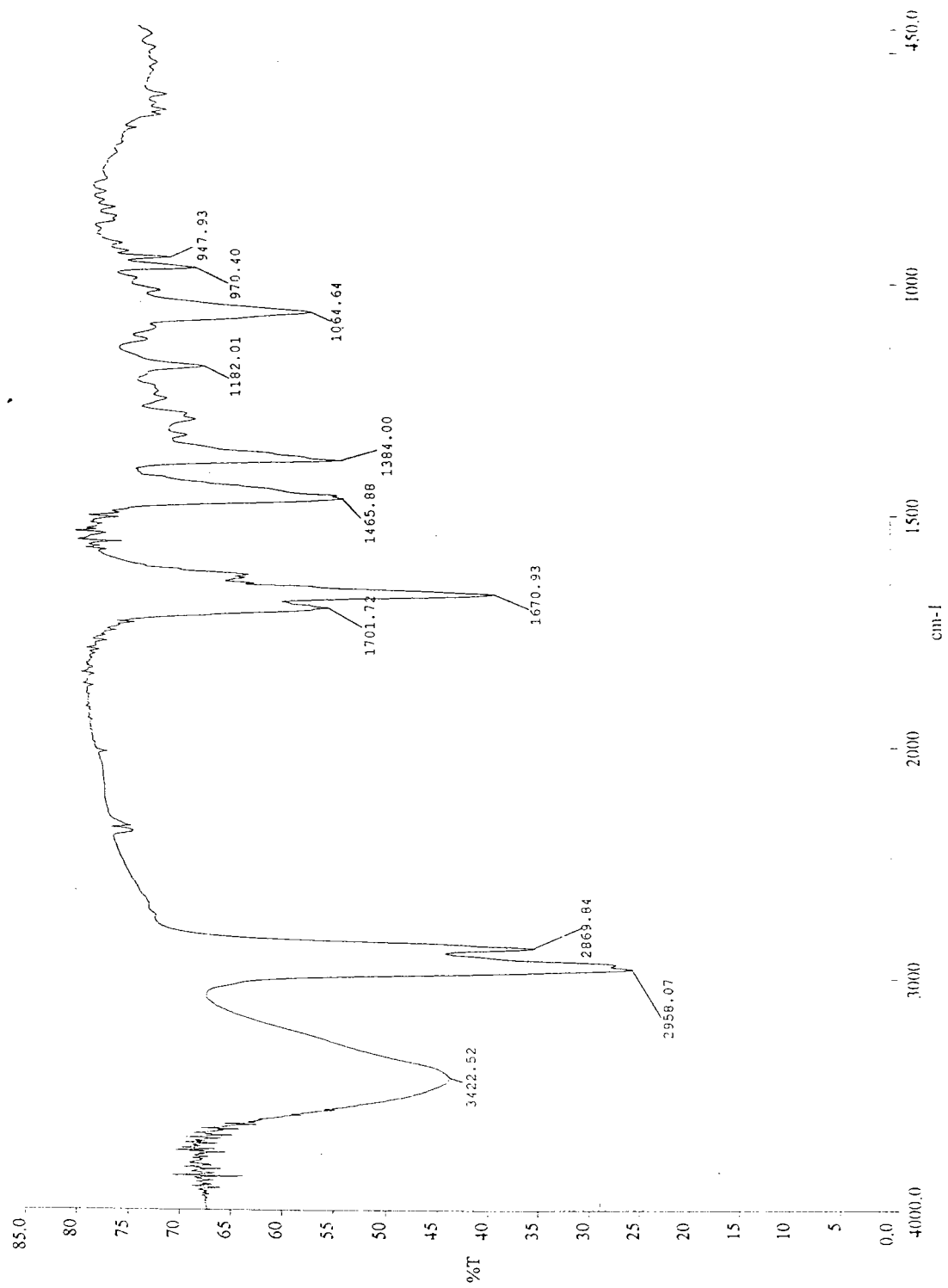
ภาพประกอบ 69 ¹³C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ D



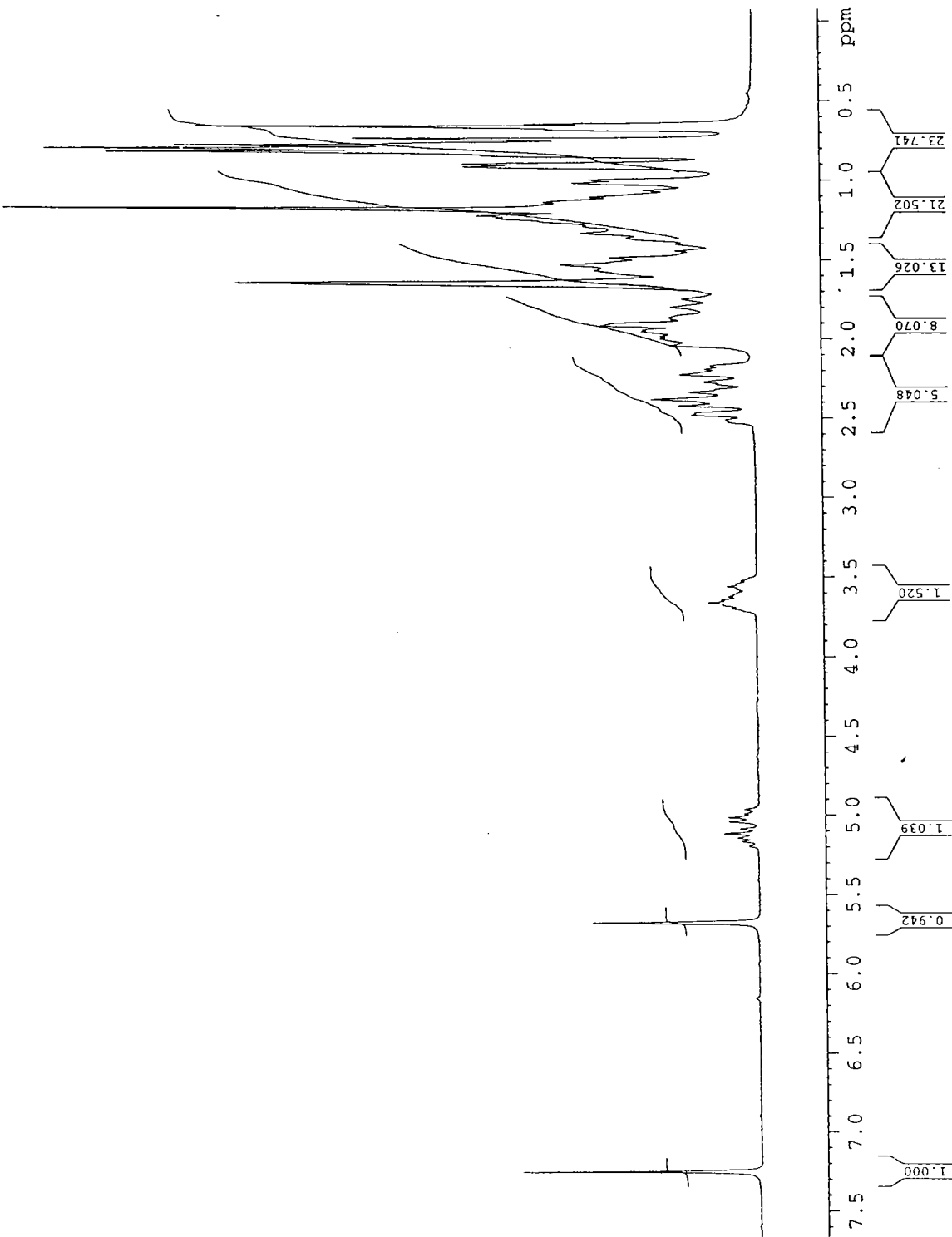
ภาพประกอบ 70 HMQC spectrum ของสารประกอบ D



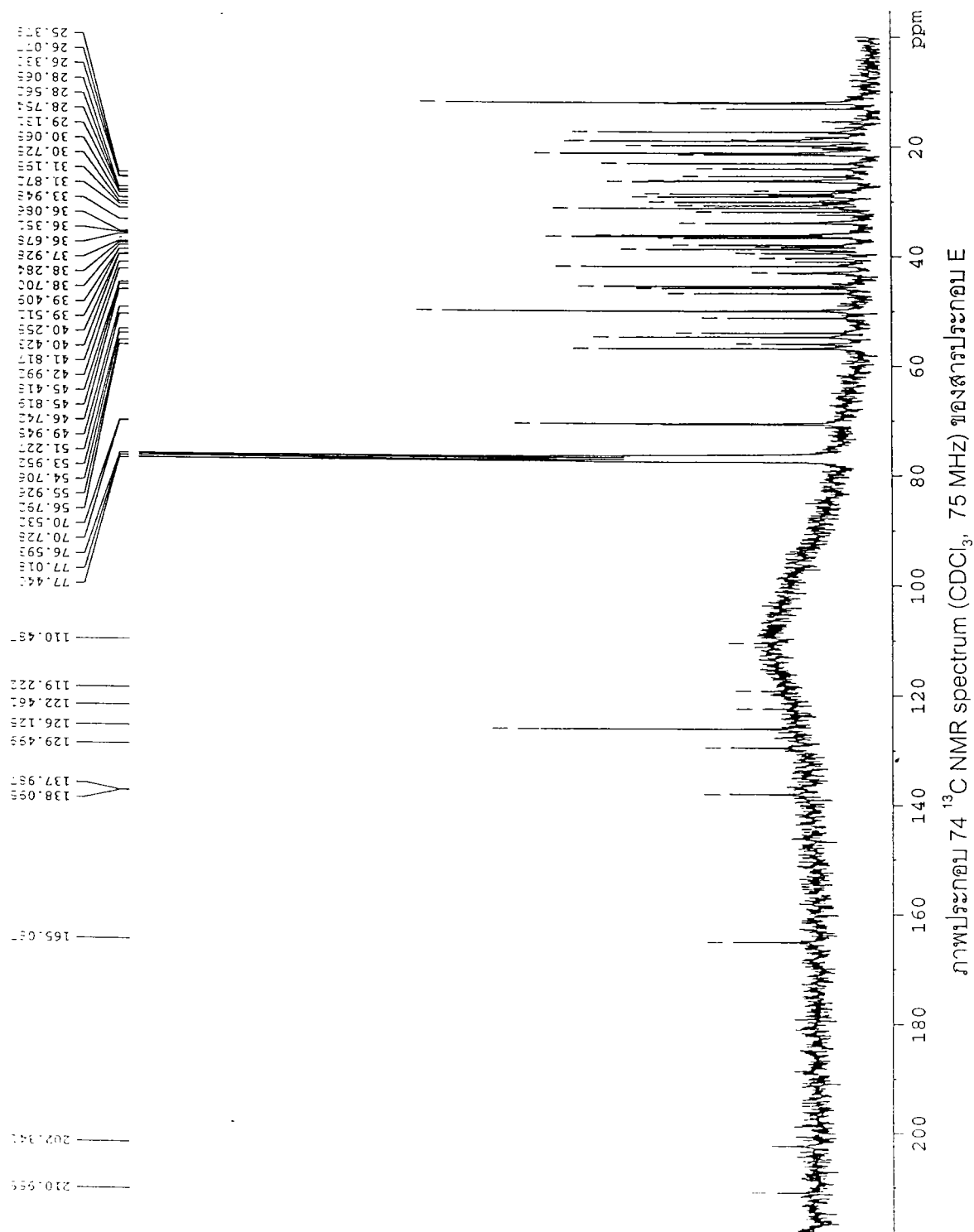
ภาพประกอบ 71 Mass spectrum ของสารประกอบ D



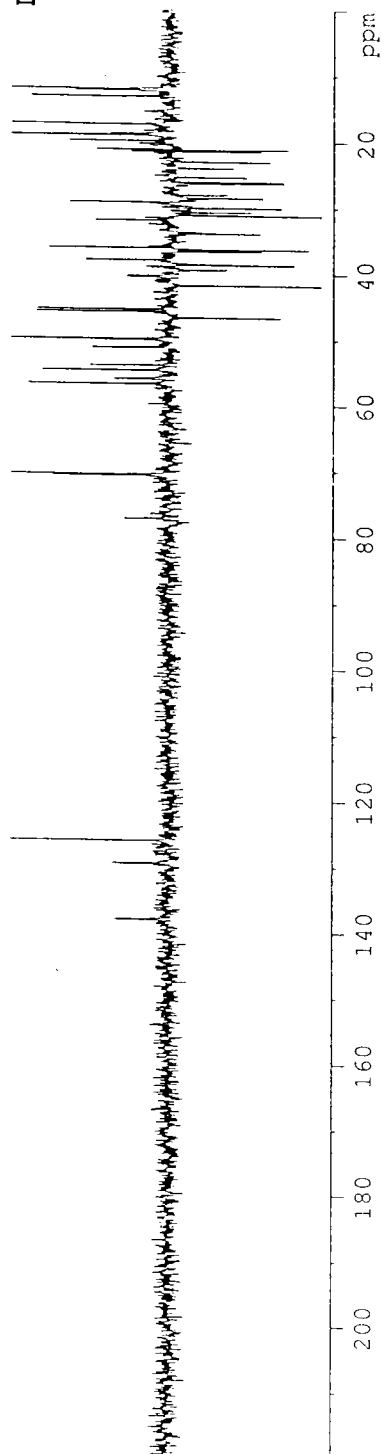
ภาพประกอบ 72 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ E



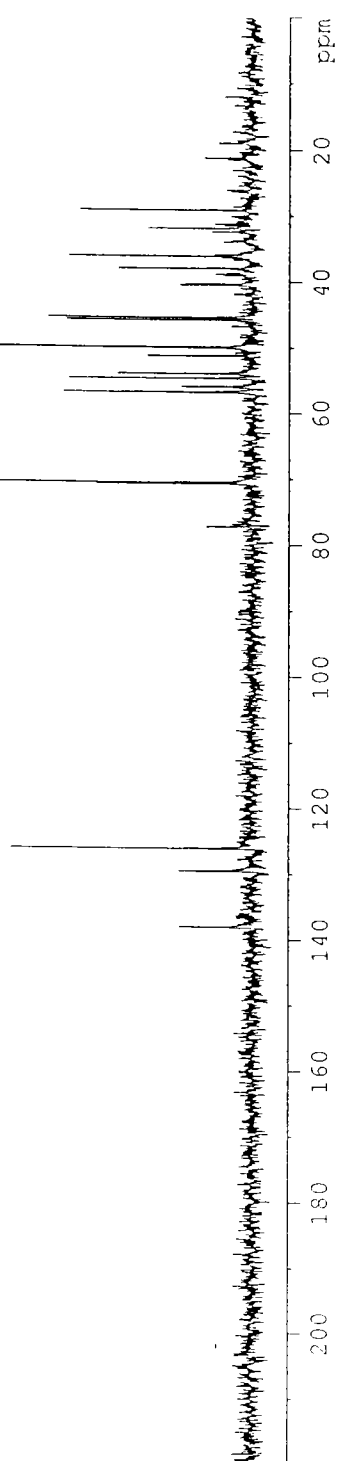
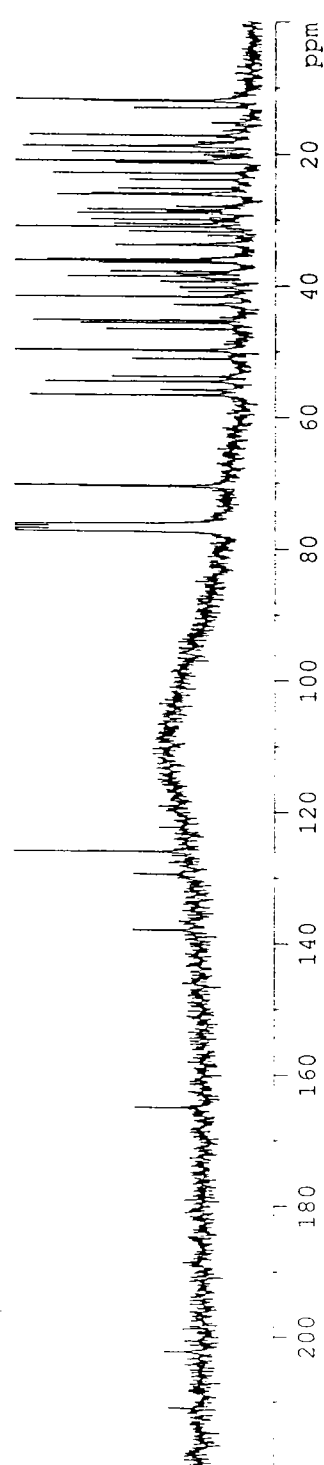
ภาพประกอบ 73 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ E

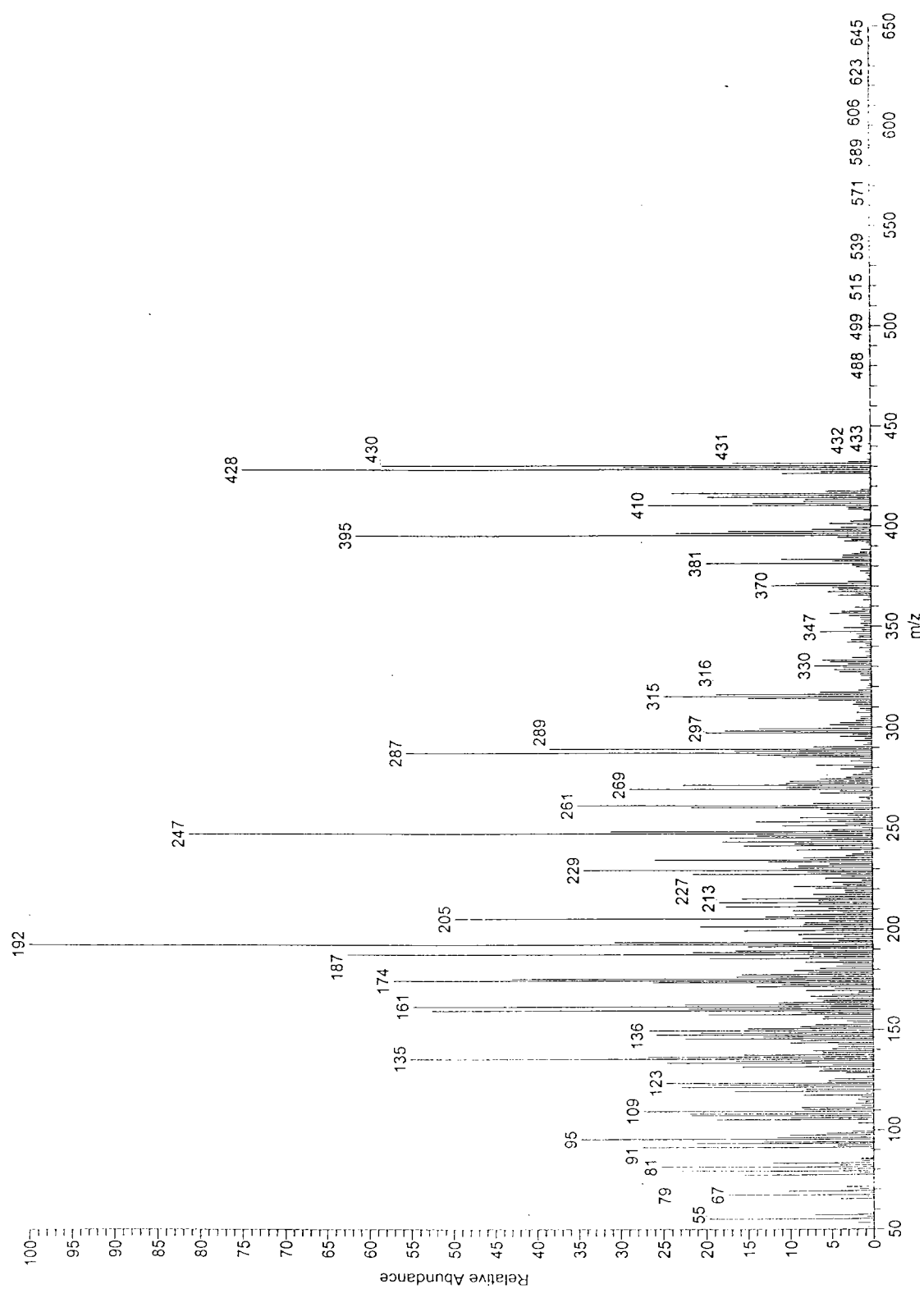


DEPT135

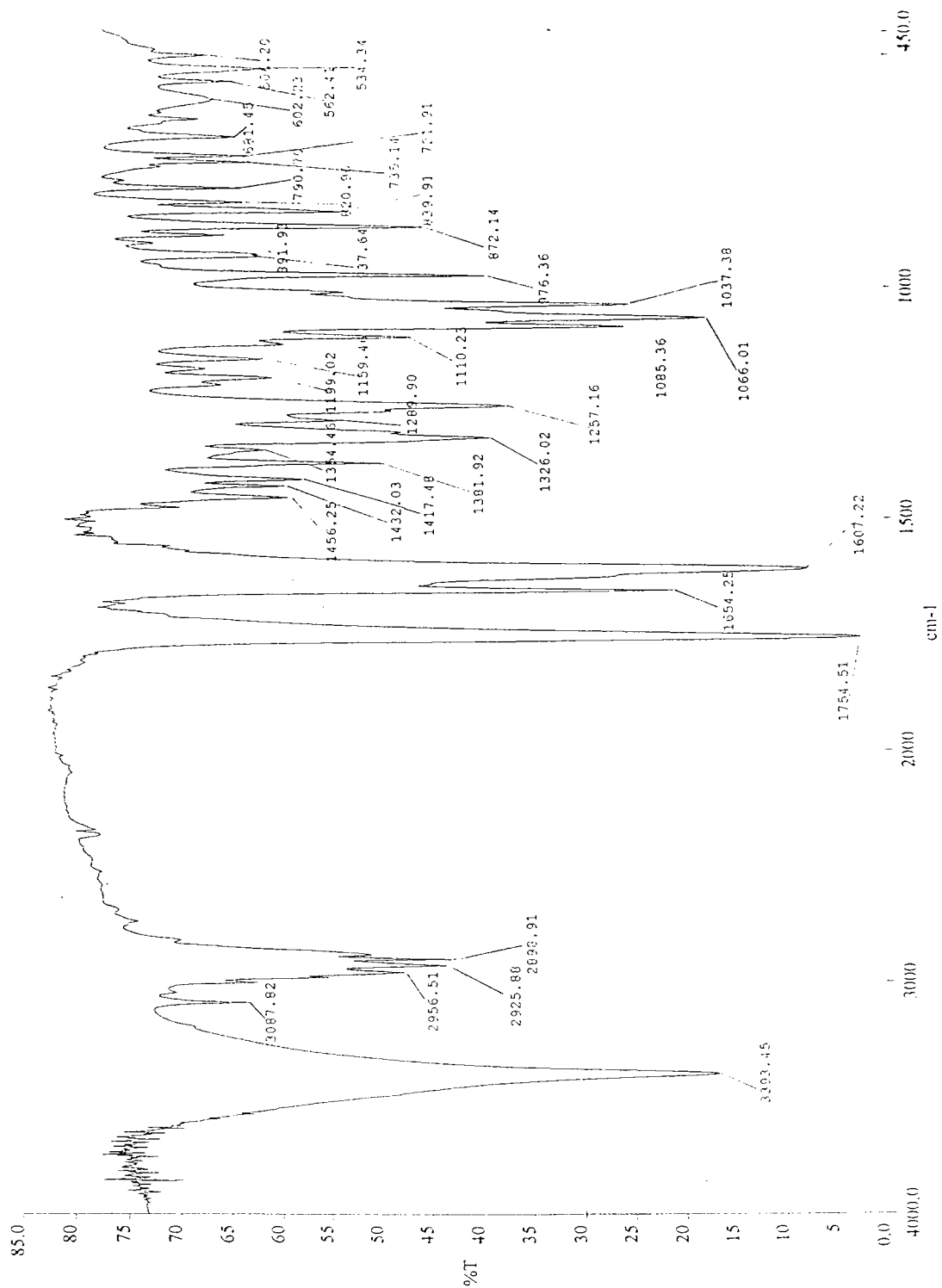


DEPT90

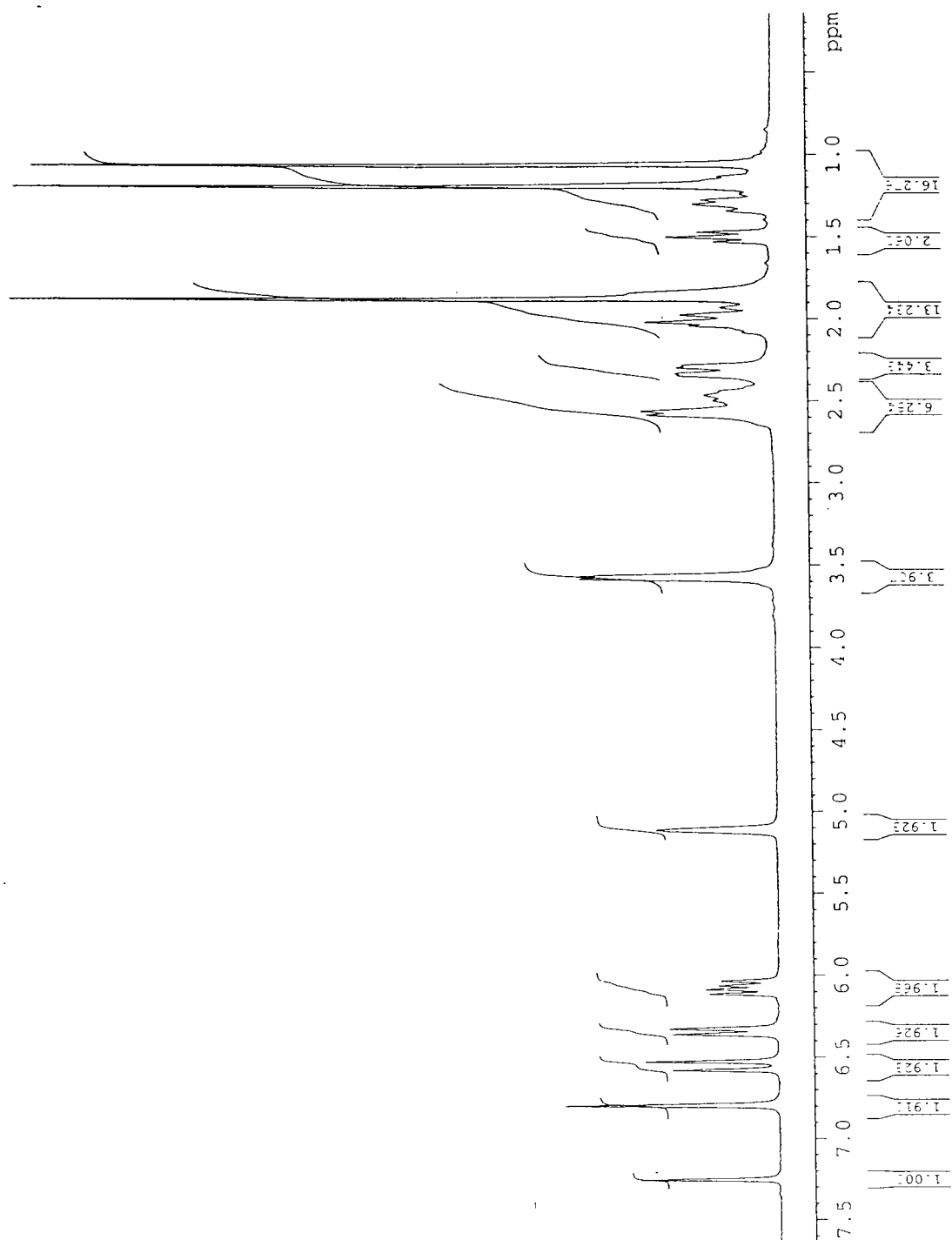
 ^{13}C ภาพประกอบ 75 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ E

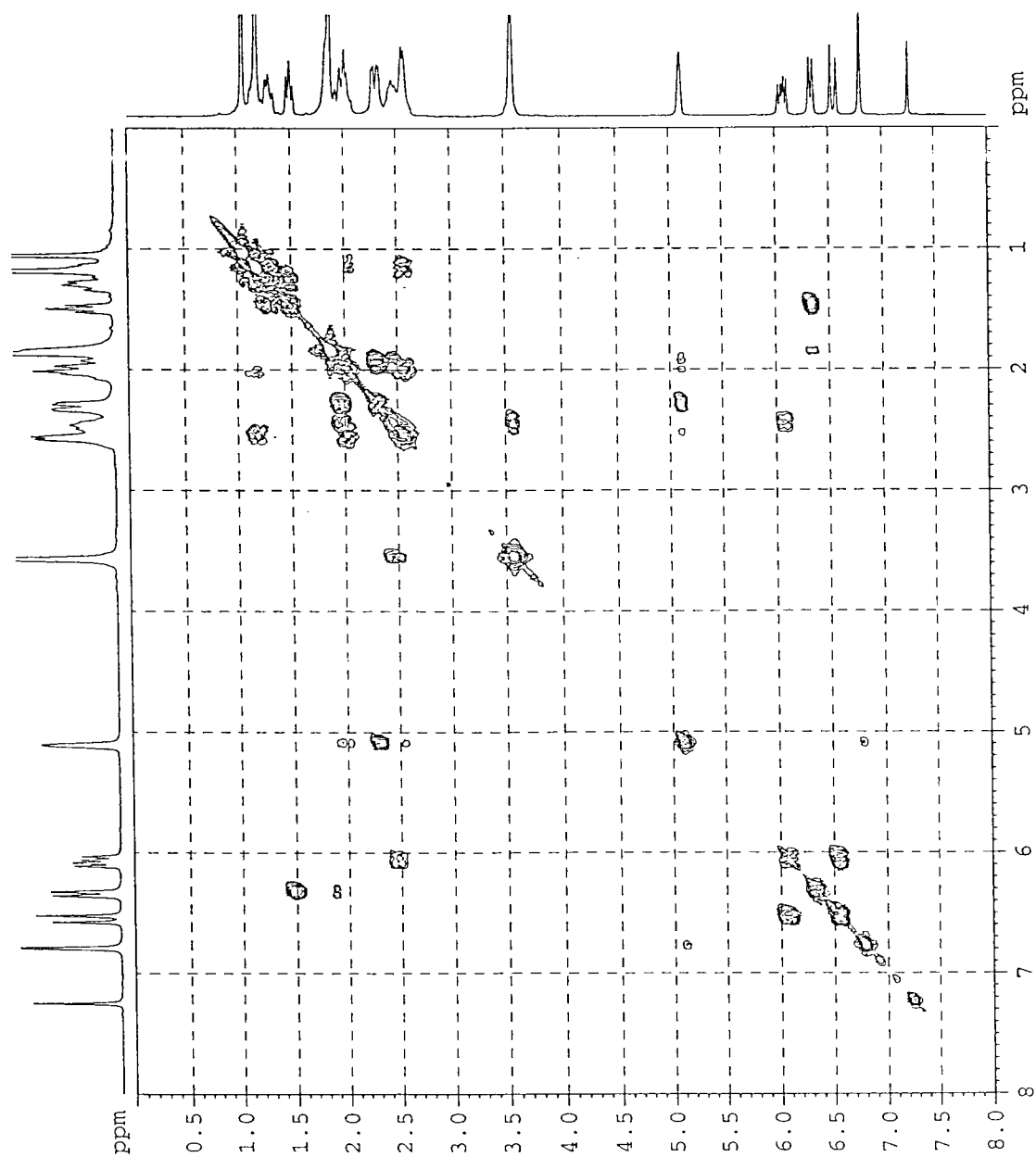


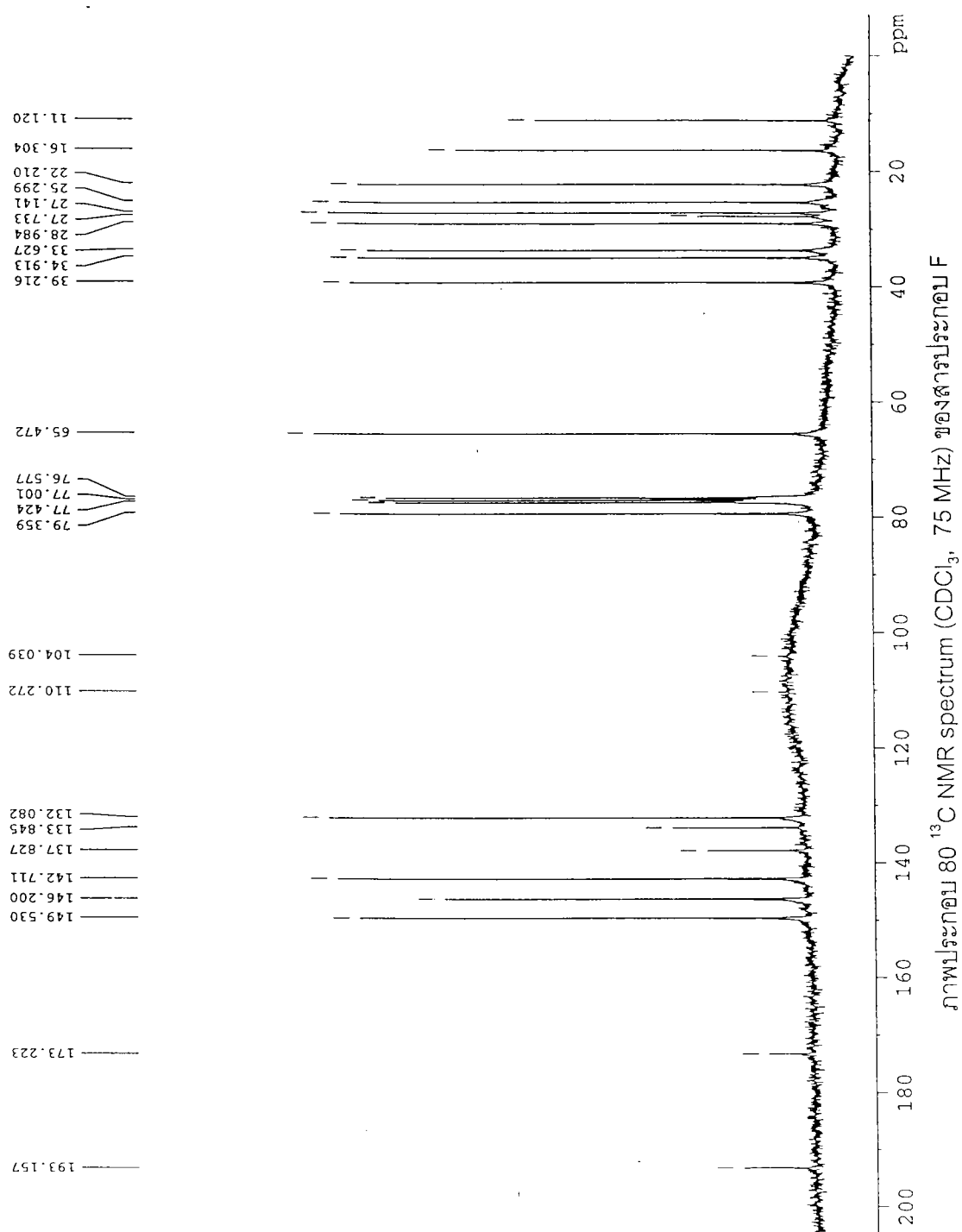
ภาพประกอบ 76 Mass spectrum ของสารประกอบ E

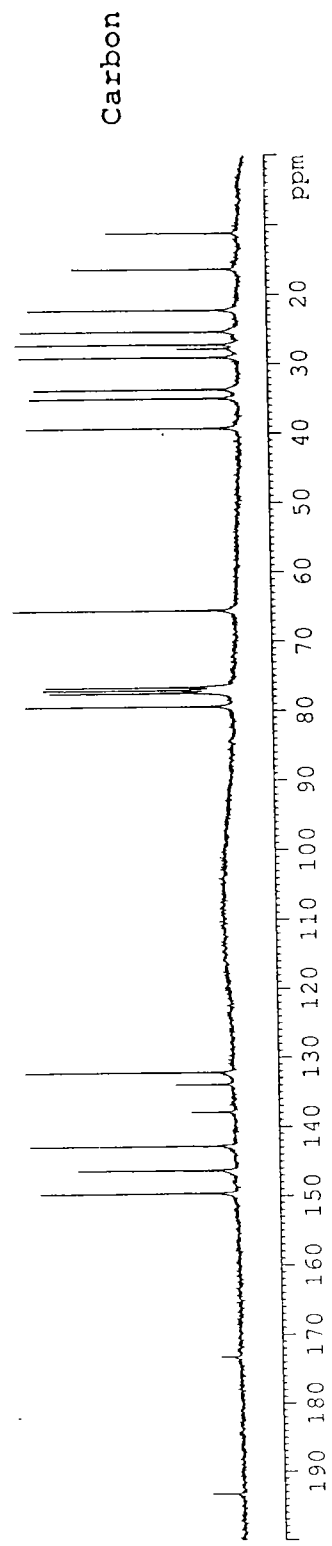
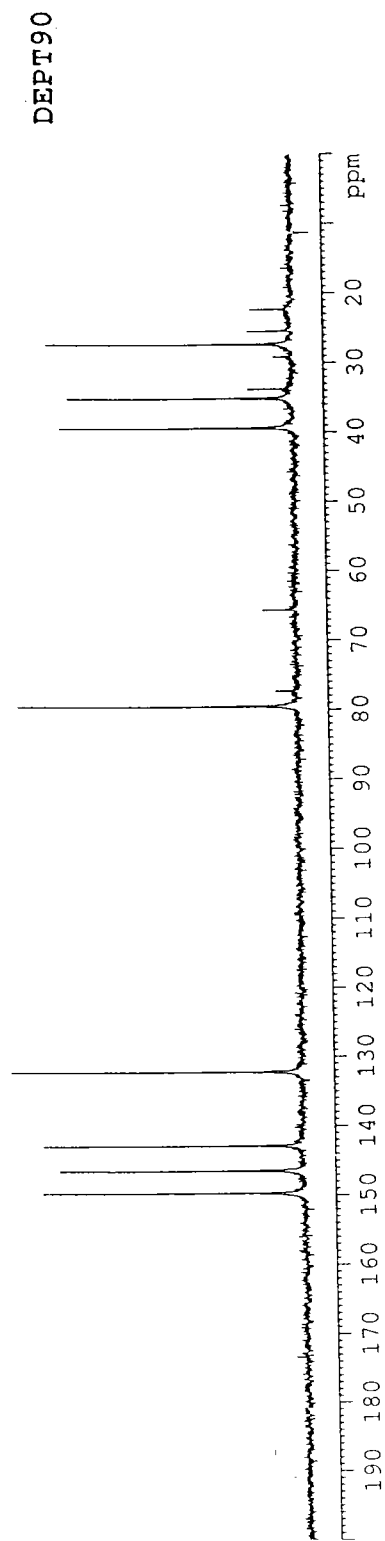
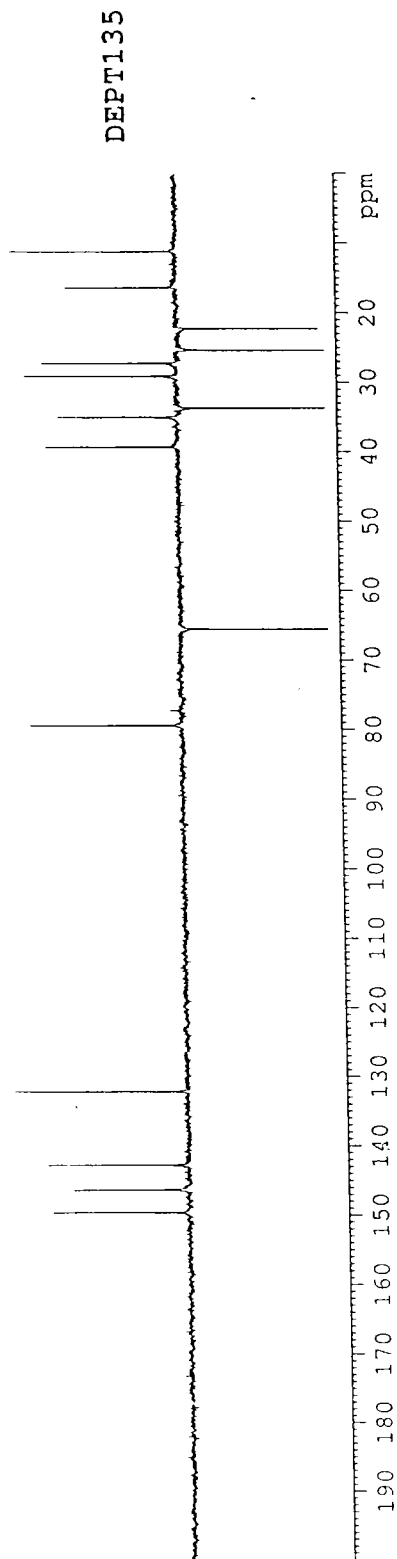


ภาพประกอบ 77 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ F

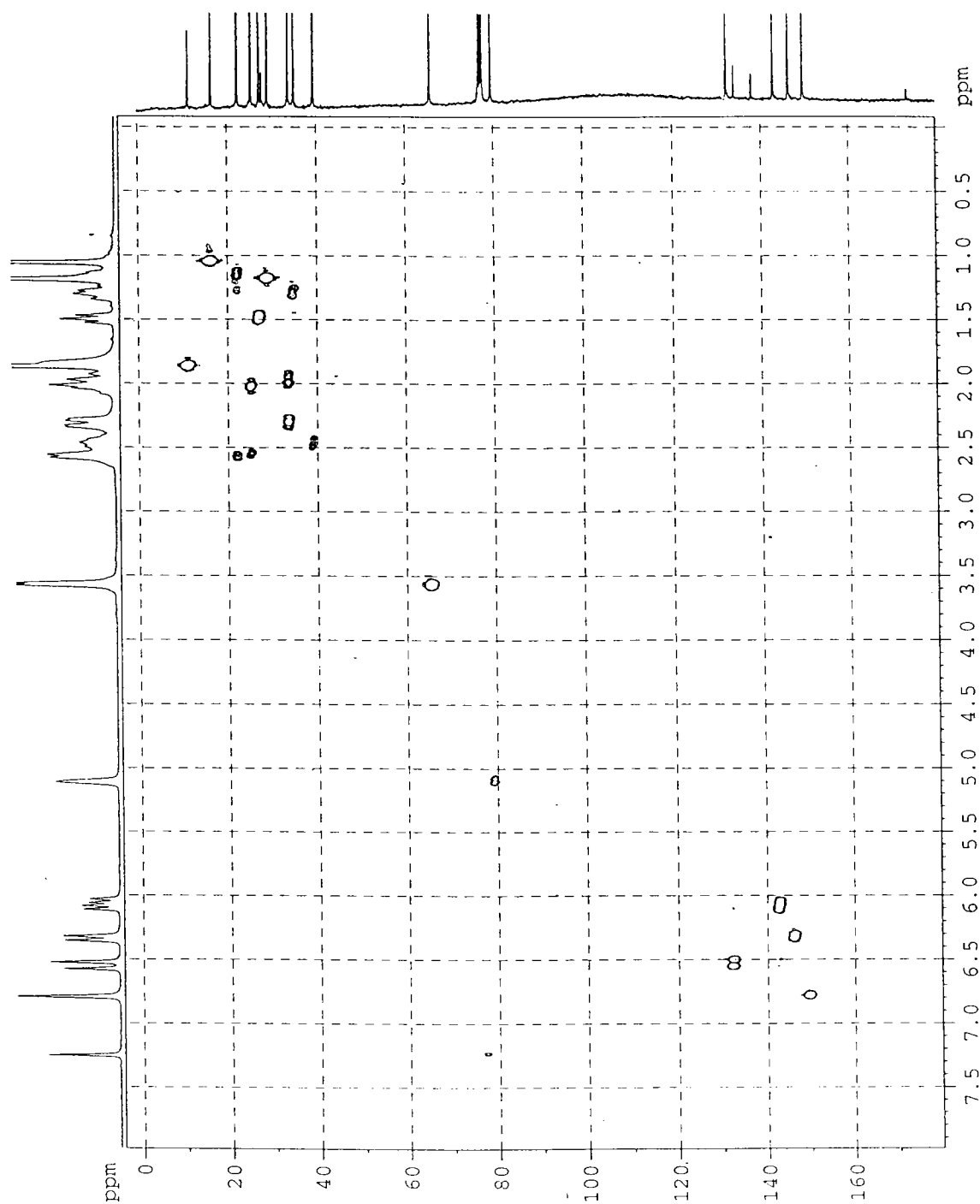
ภาพประกอบ 78 ^1H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ F

ภาพประกอบ 79 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ F

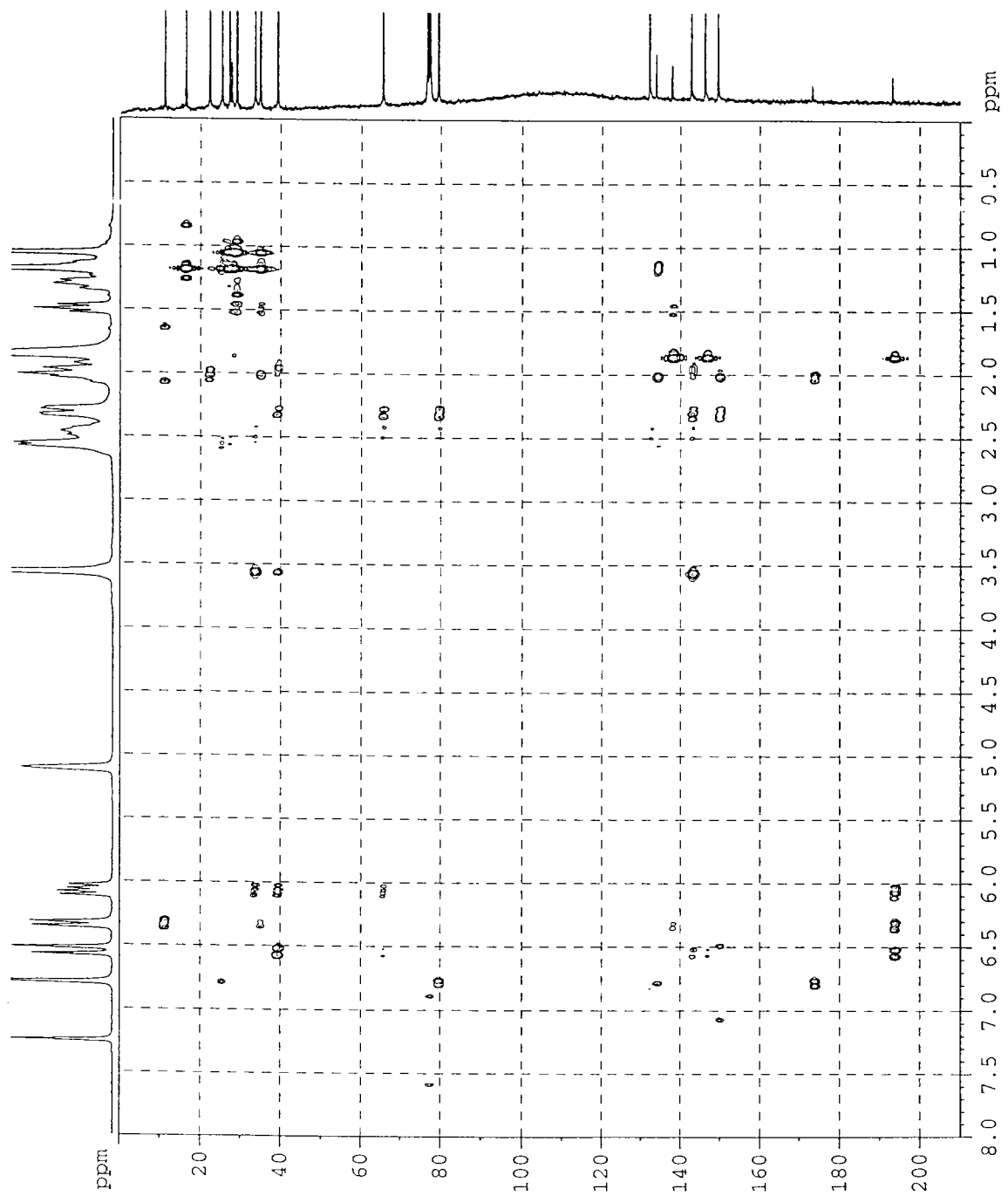




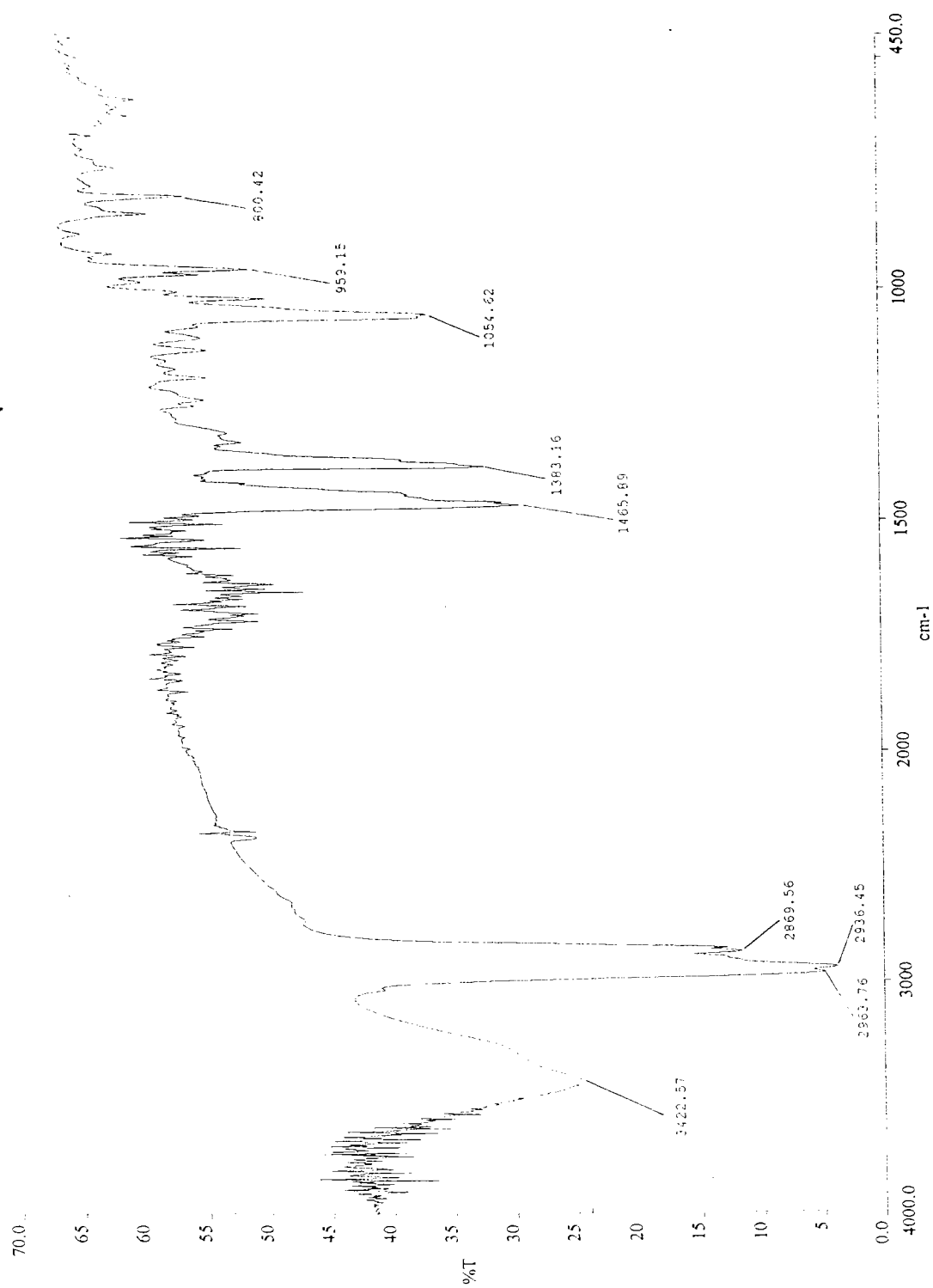
ภาพประกอบ 81 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ F



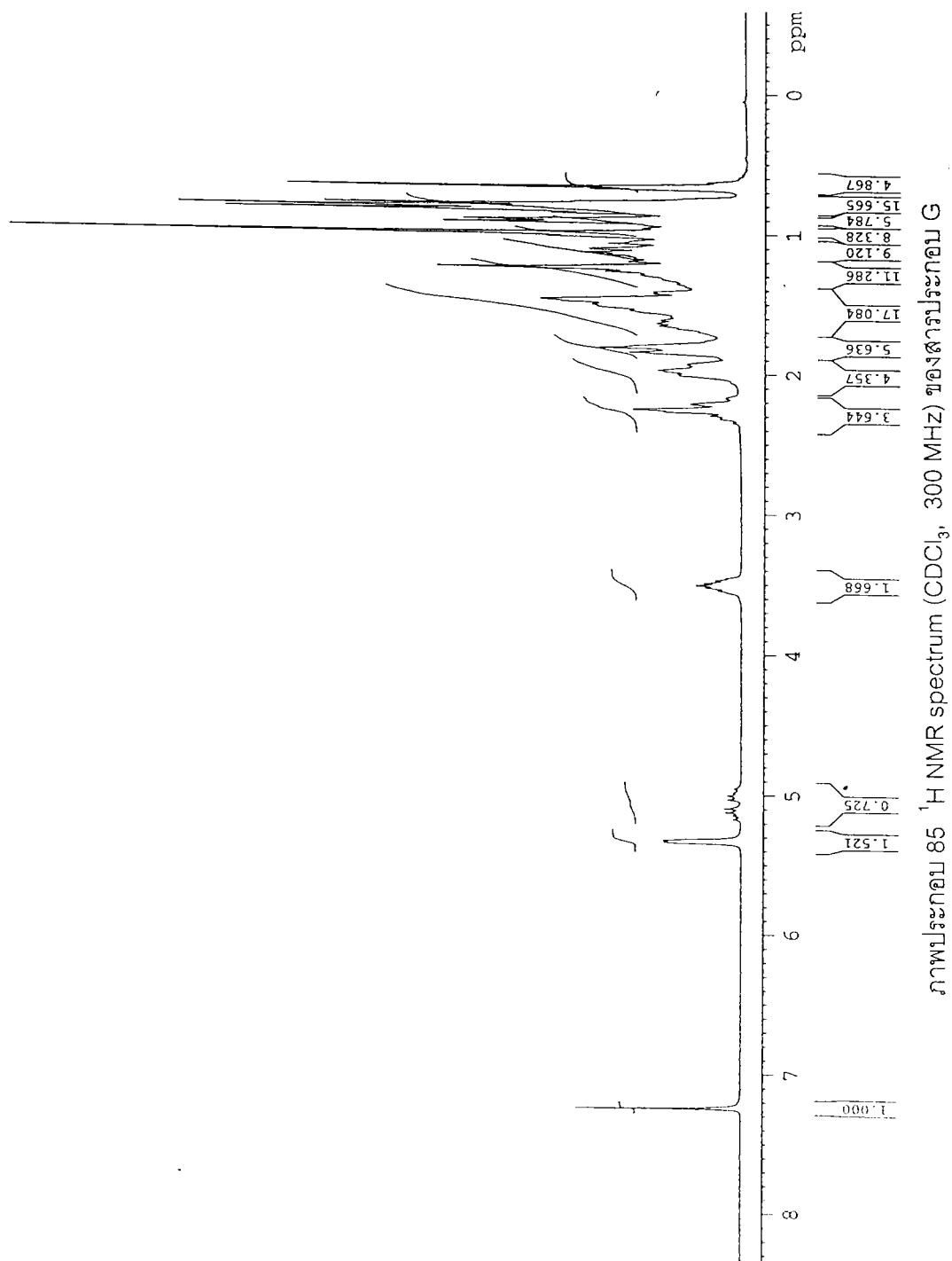
ภาพประกอบ 82 HMQC spectrum ของสารประกอบ F

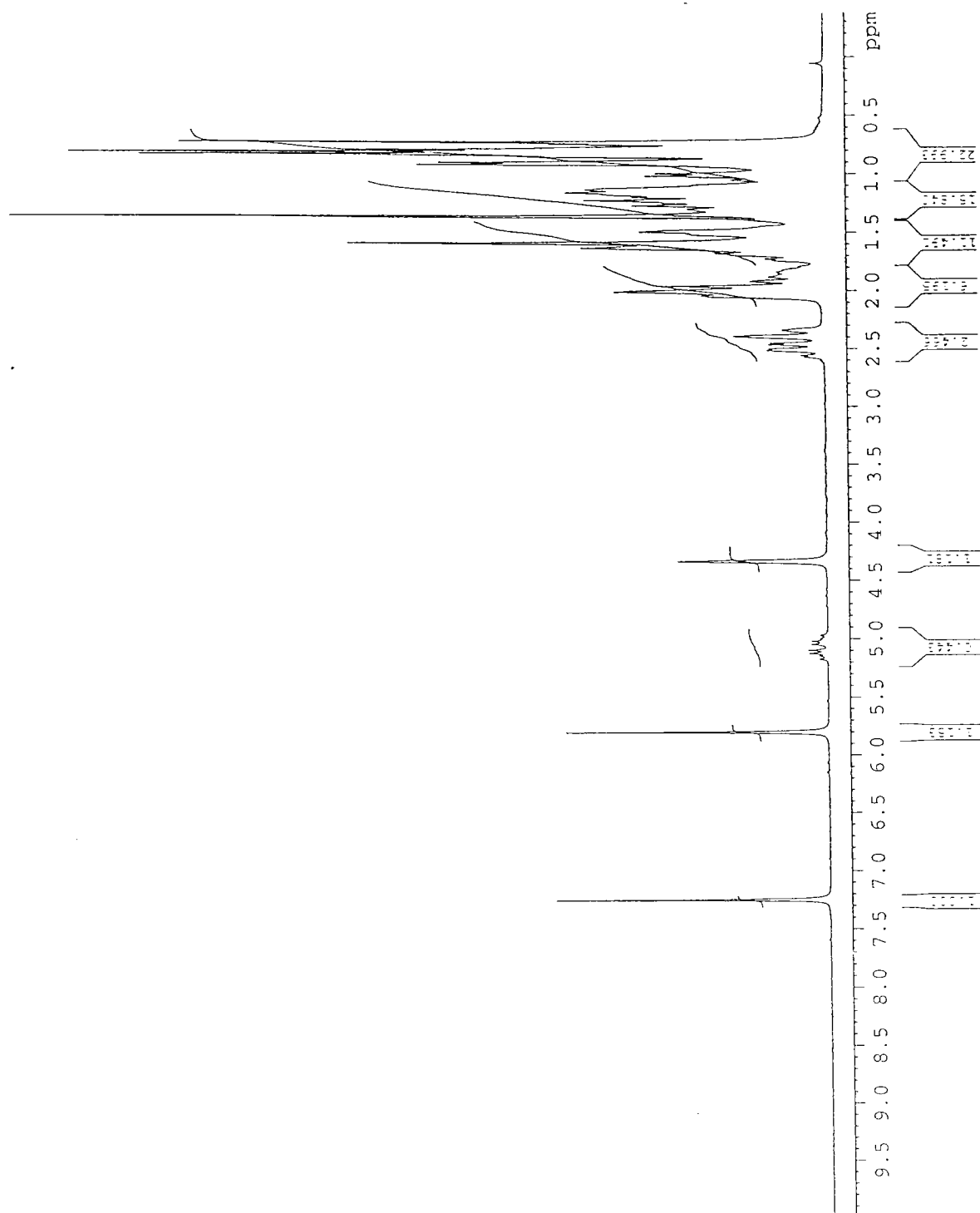


ภาพประกอบ 83 HMB spectrum ของสารประกอบ F

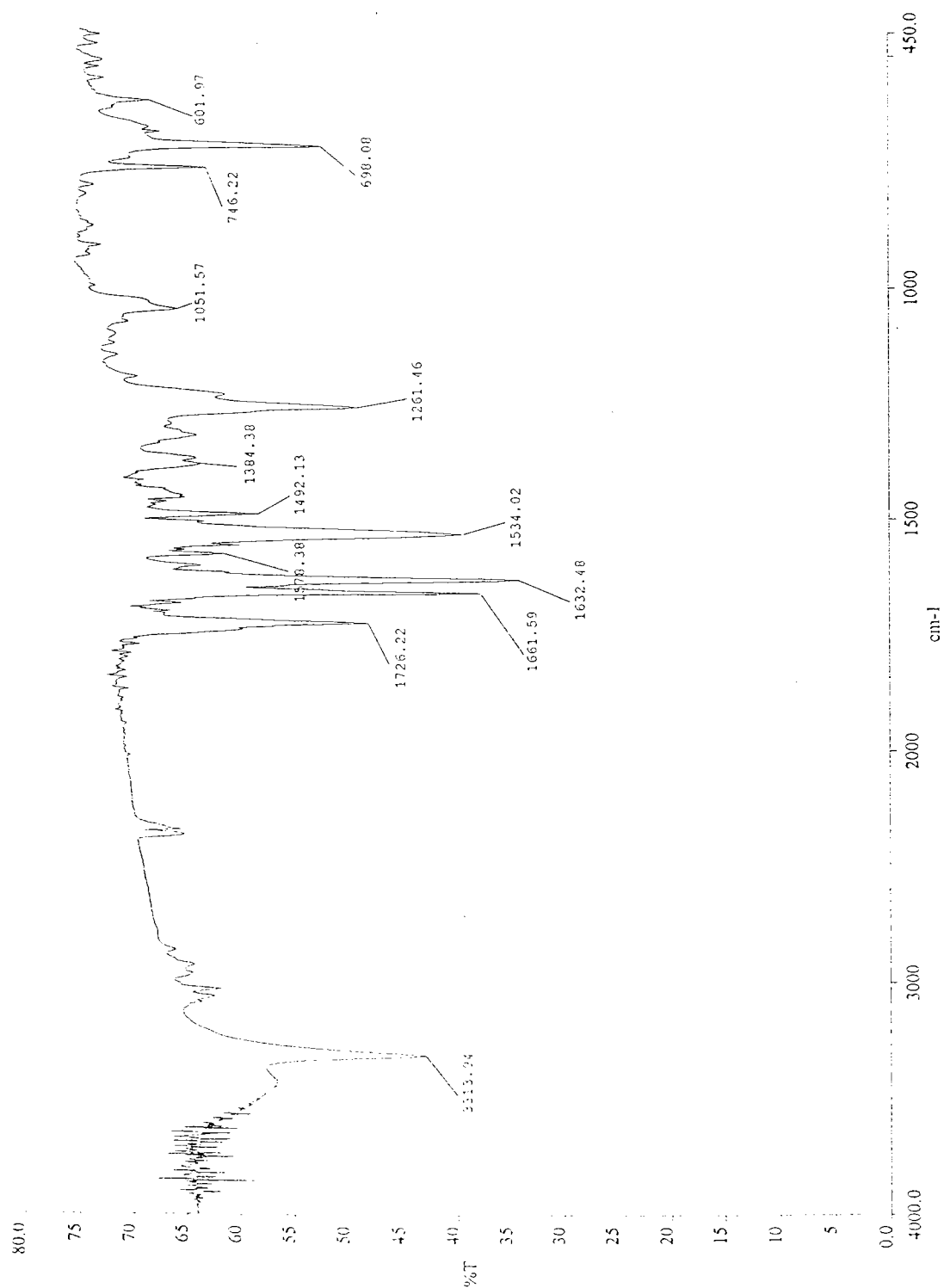


ภาพประกอบ 84 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ G

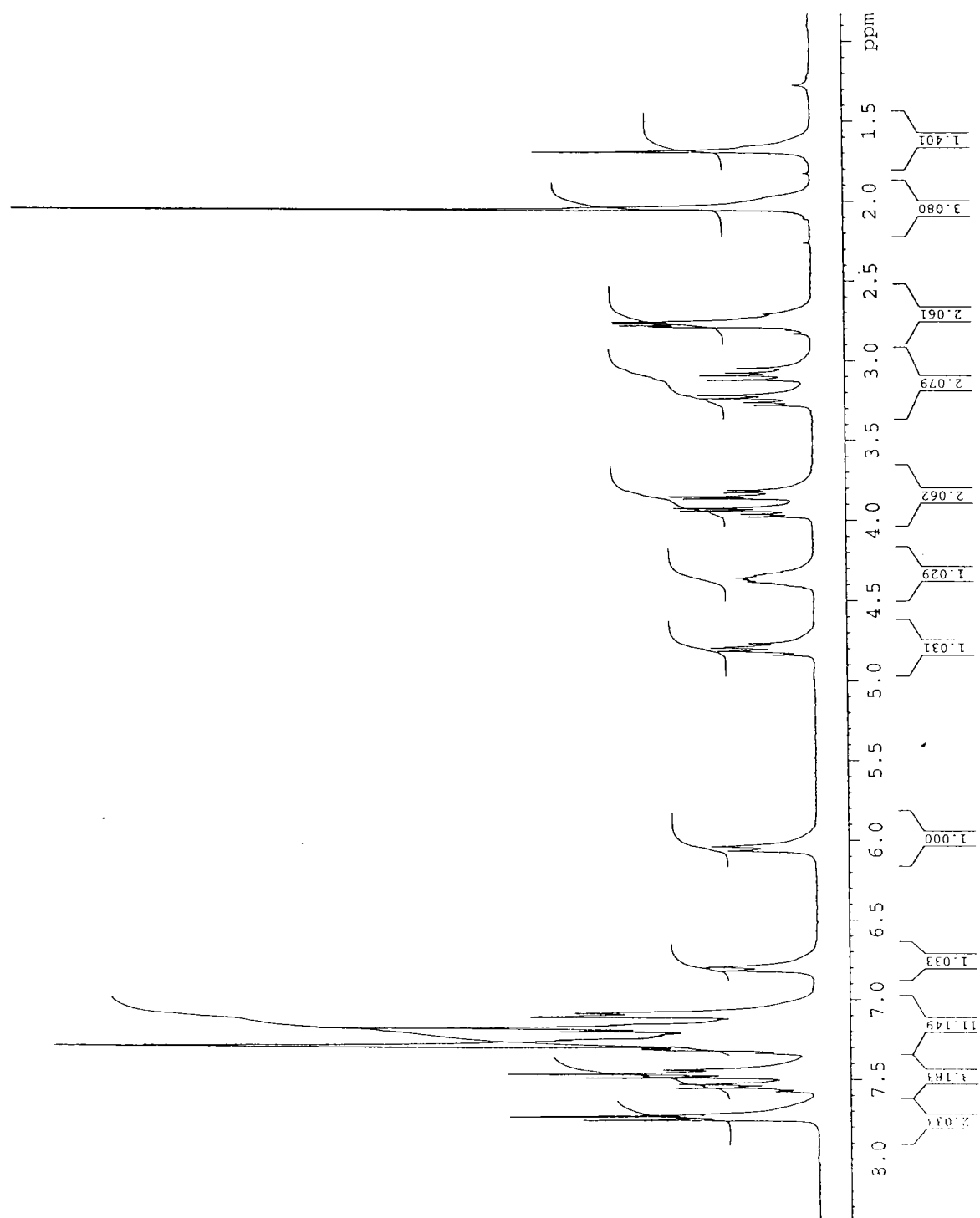




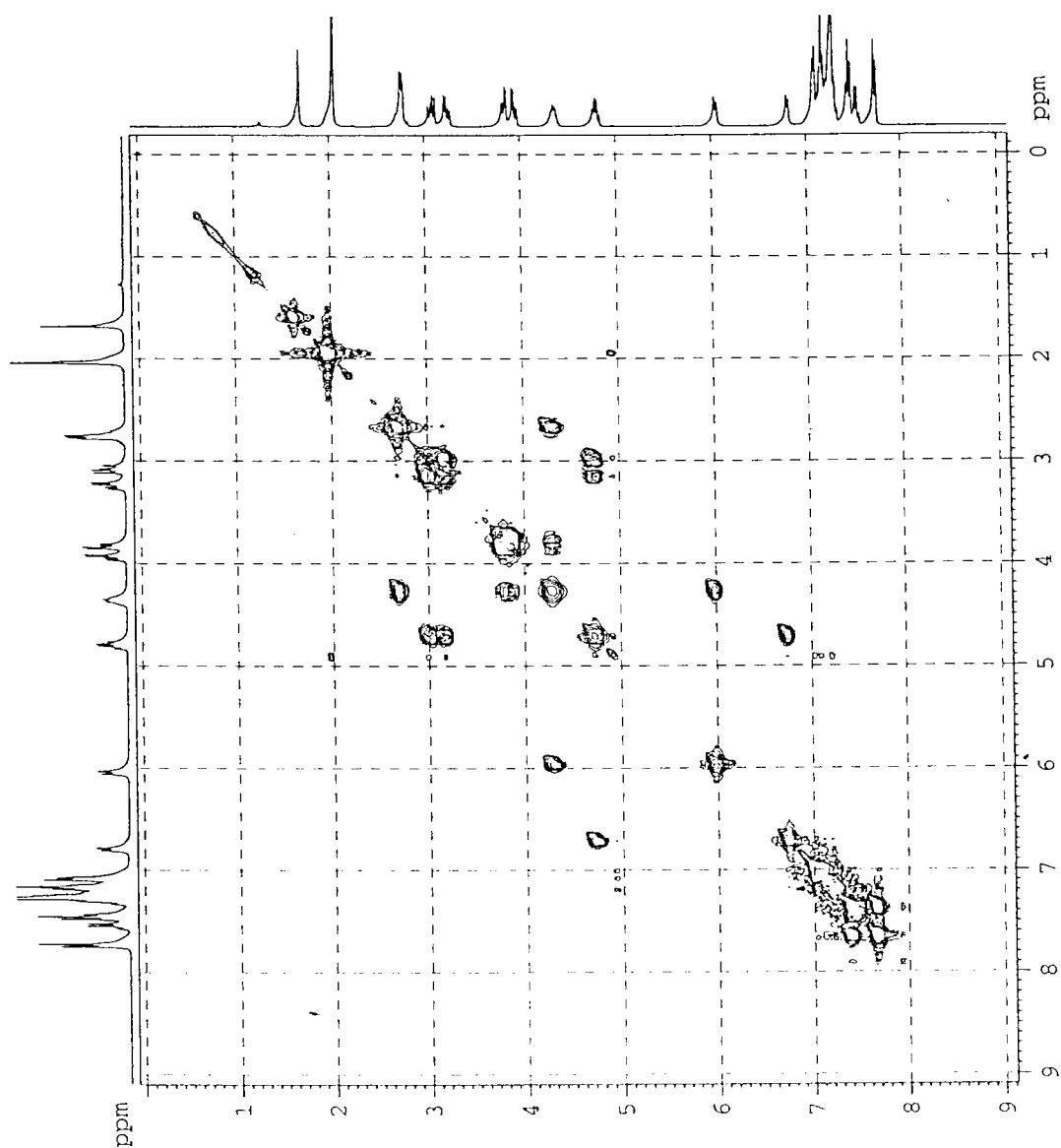
ภาพประกอบ 86 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ H



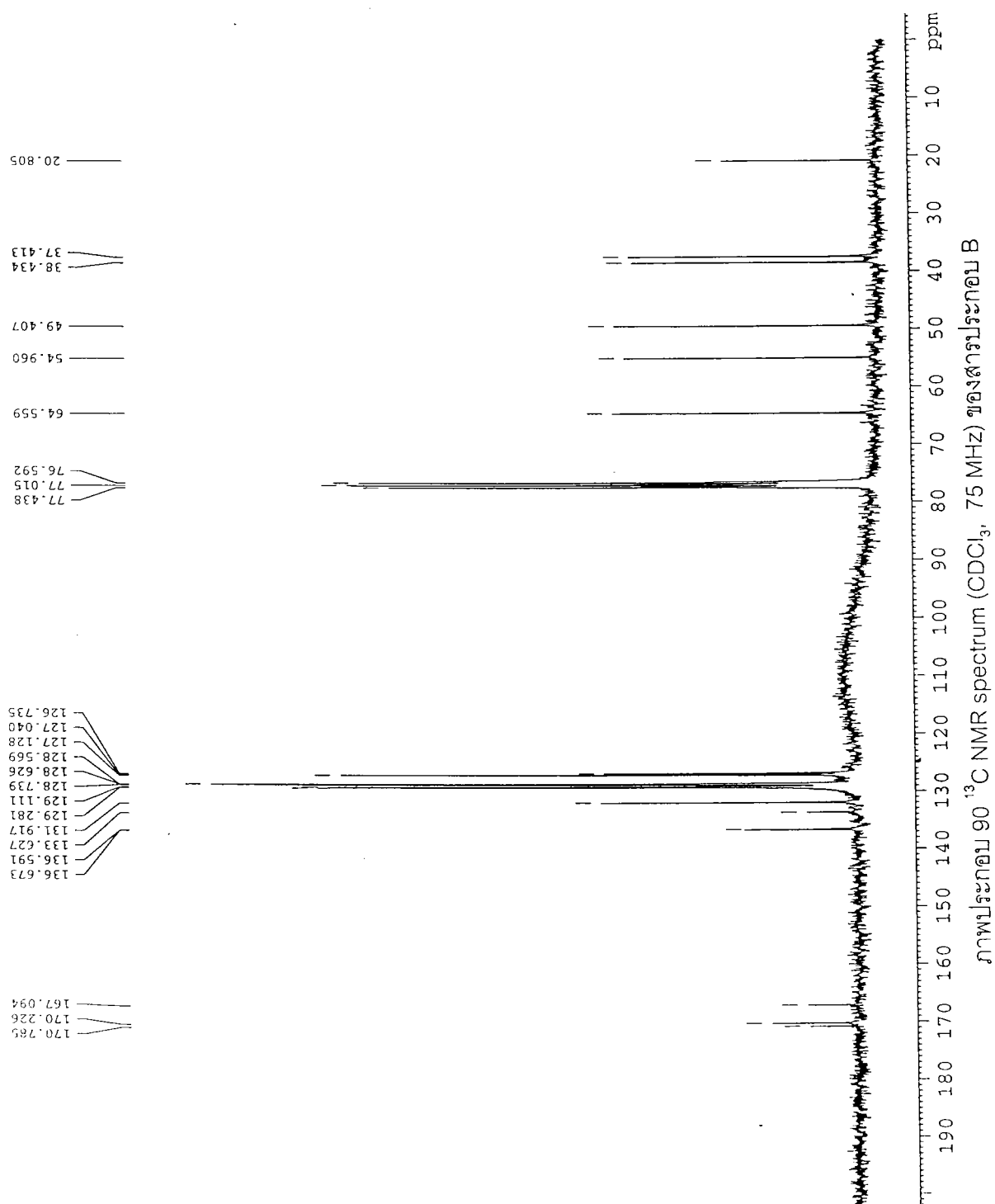
ภาพประกอบ 87 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ I

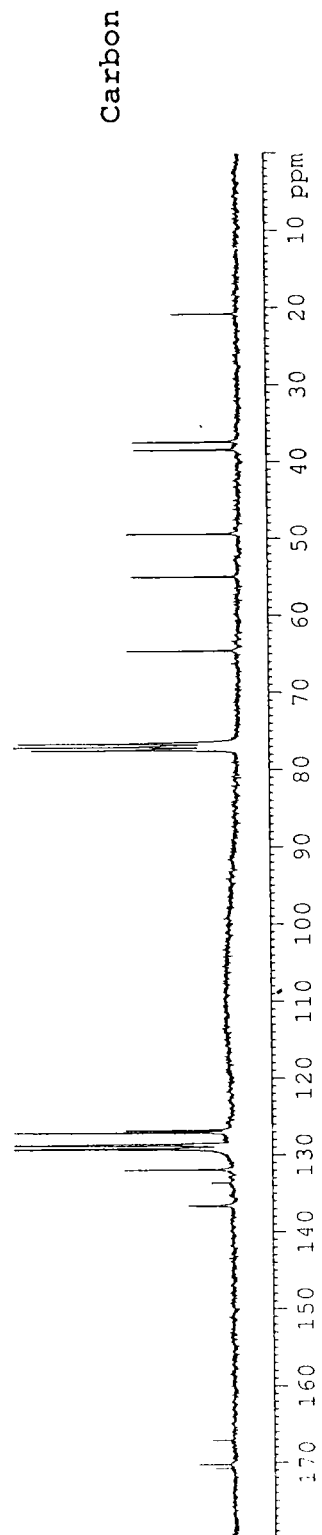
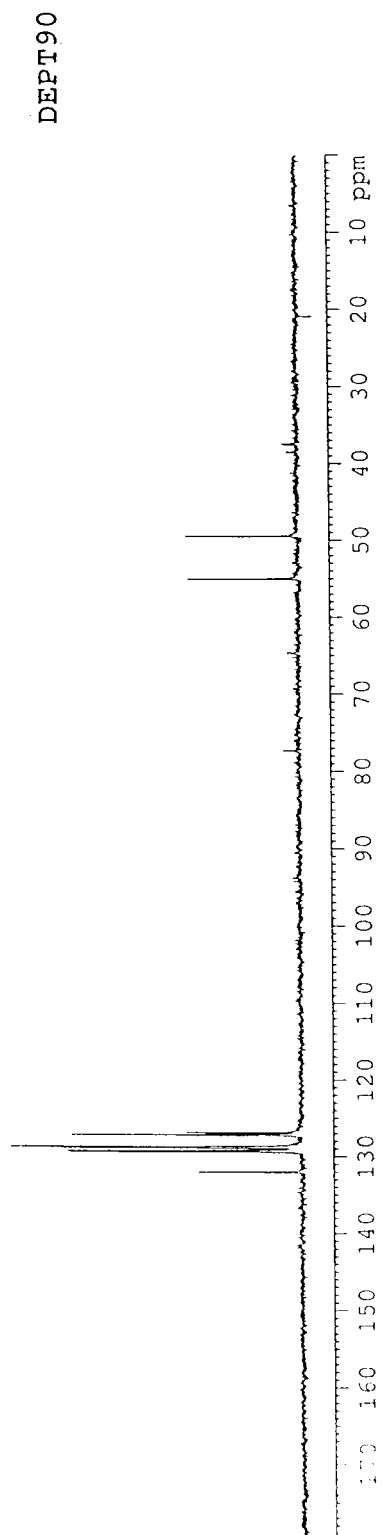
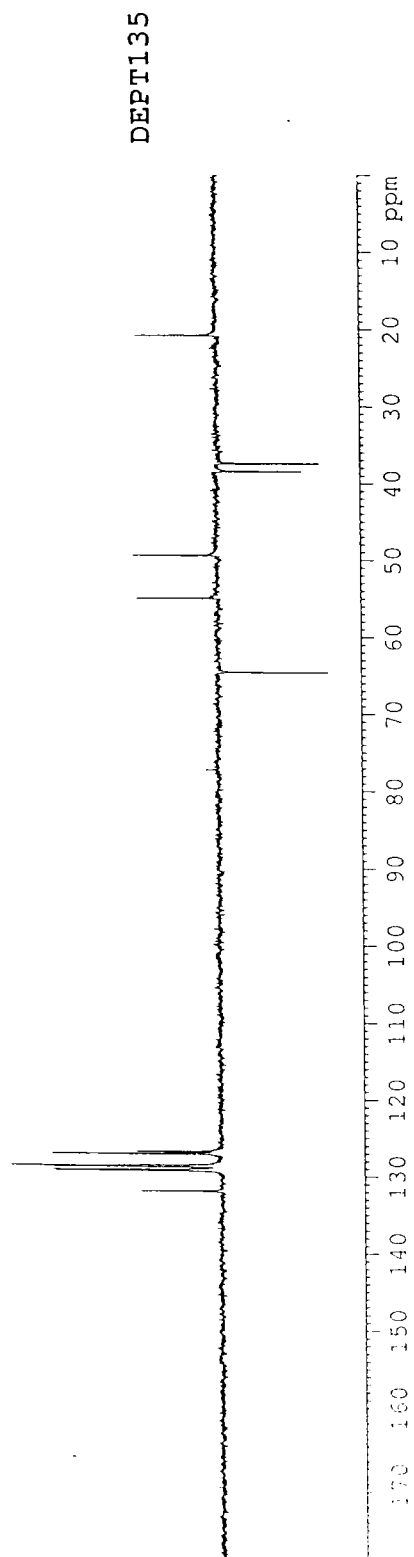


ภาพประกอบ 88 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ I

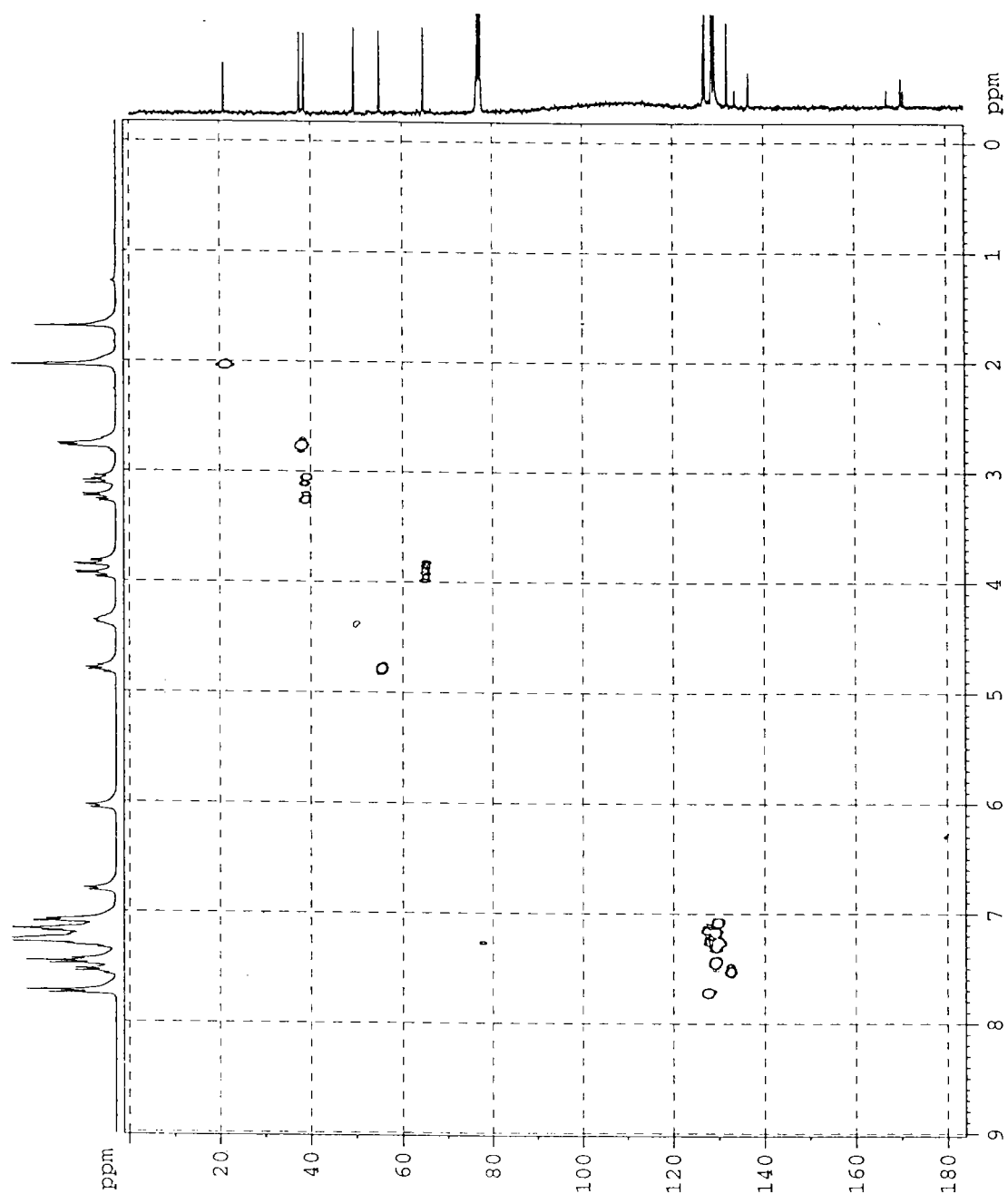


ภาพประกอบ 89 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ I

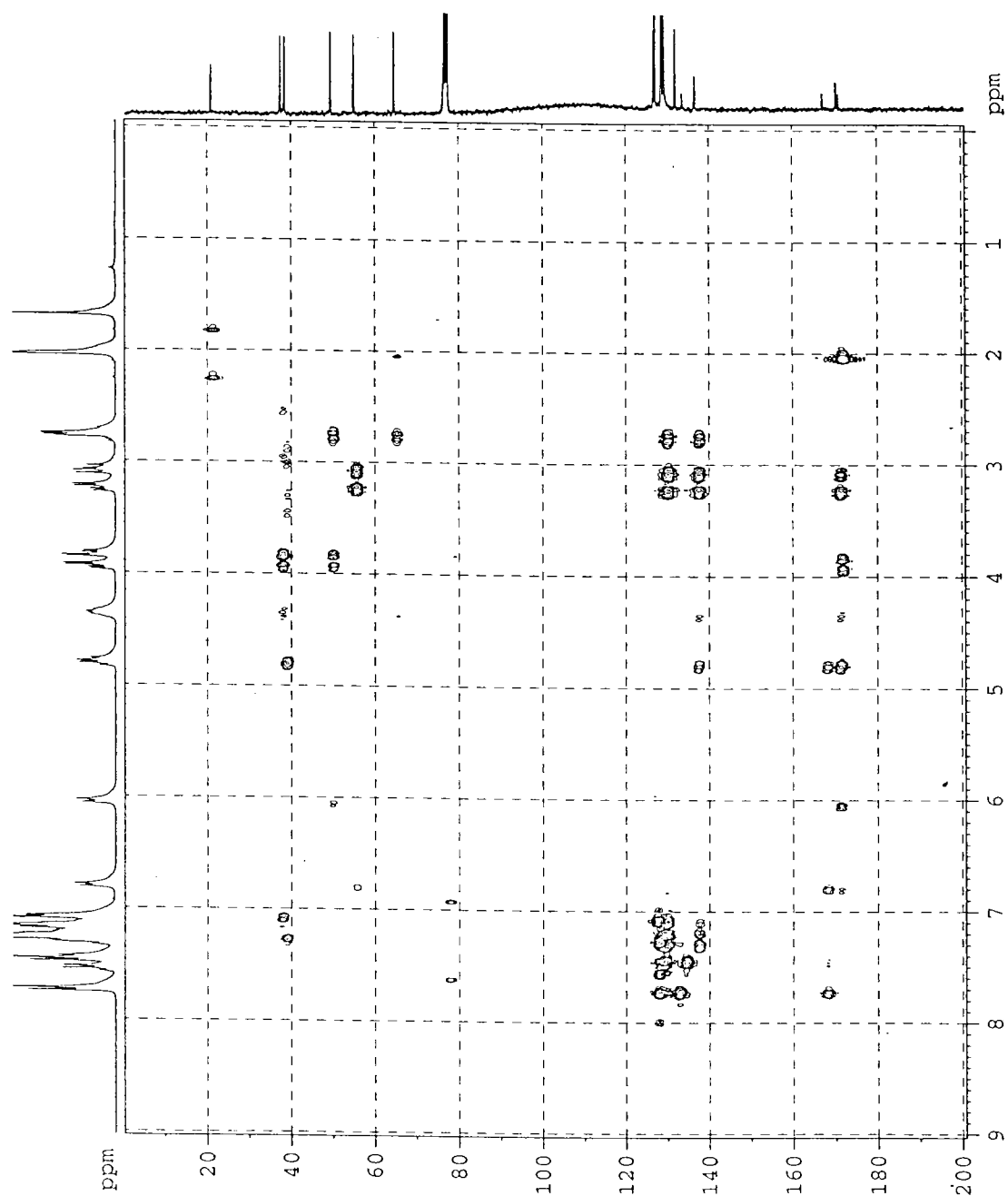




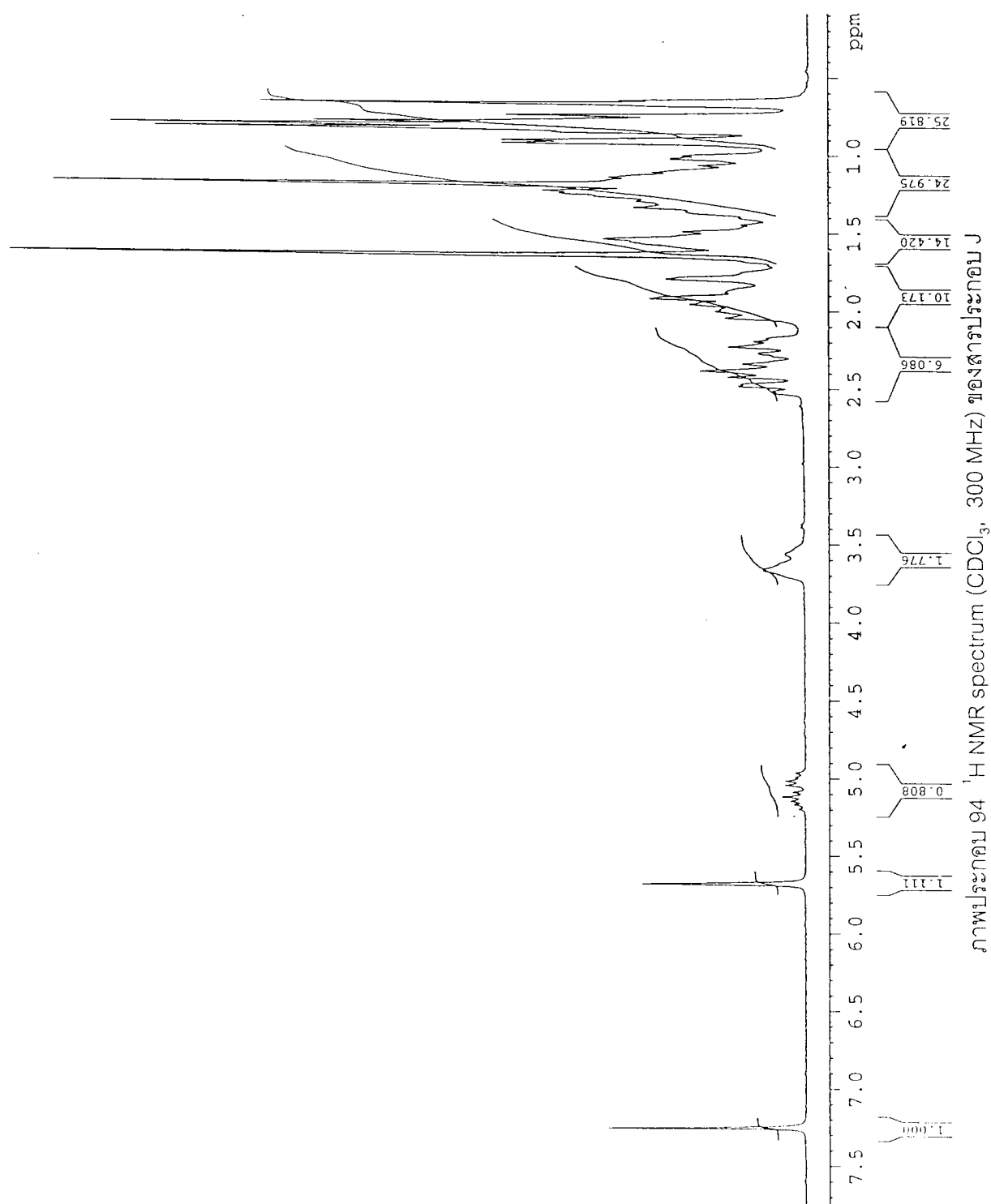
ภาพประกอบ 91 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B

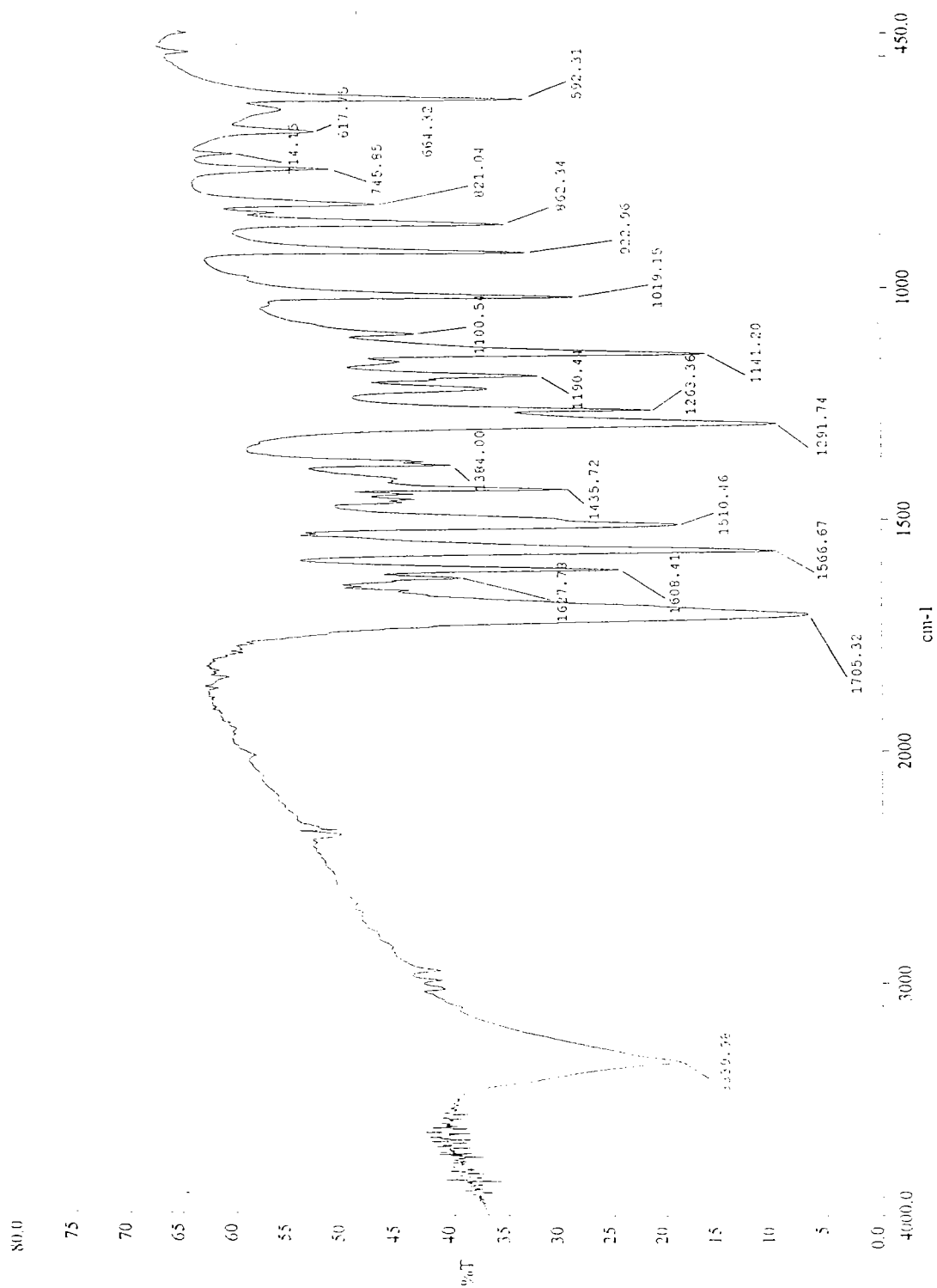


ภาพประกอบ 92 HMQC spectrum ของสารประกอบ I

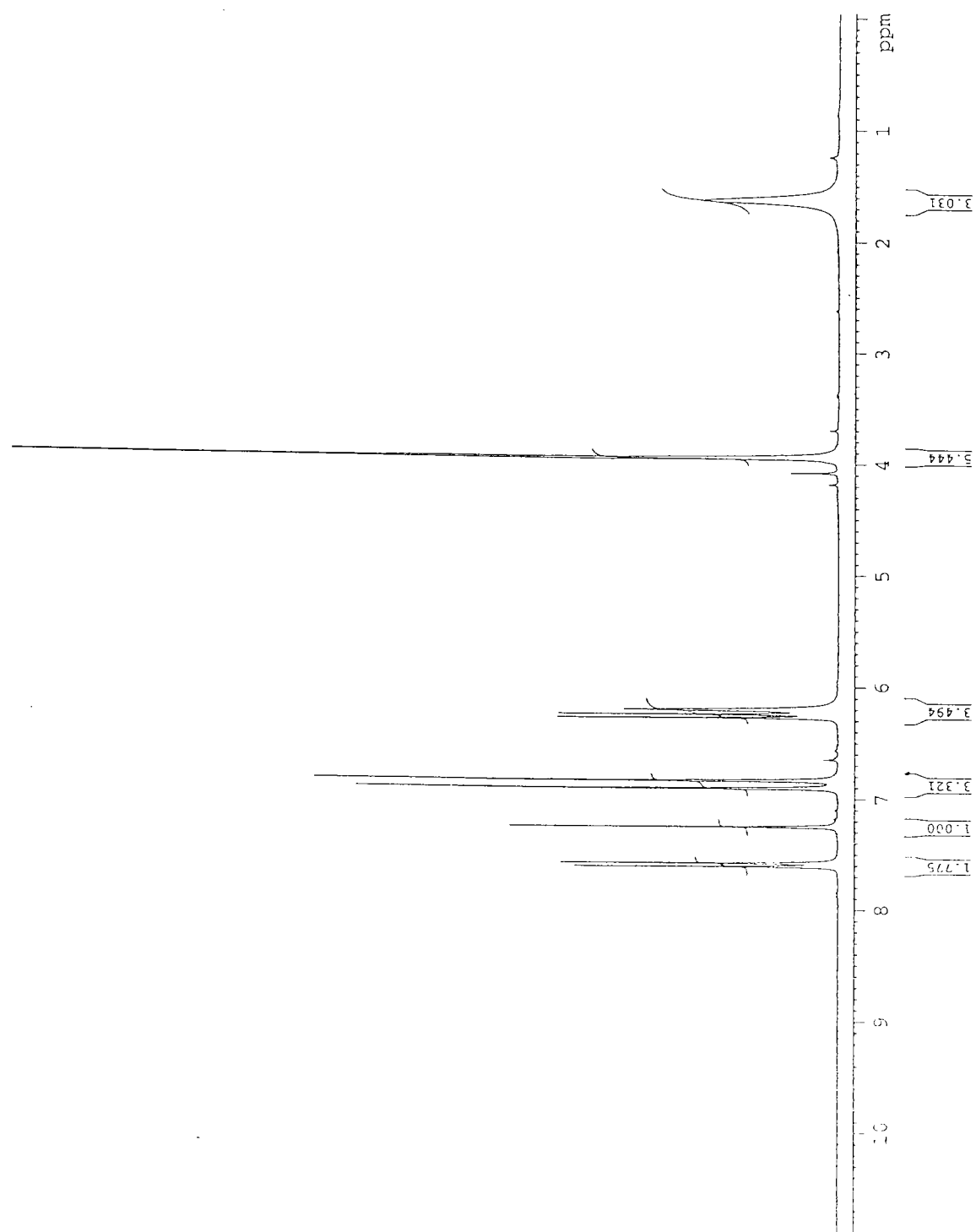


ภาพประกอบ 93 HMBC spectrum ของสารประกอบ I

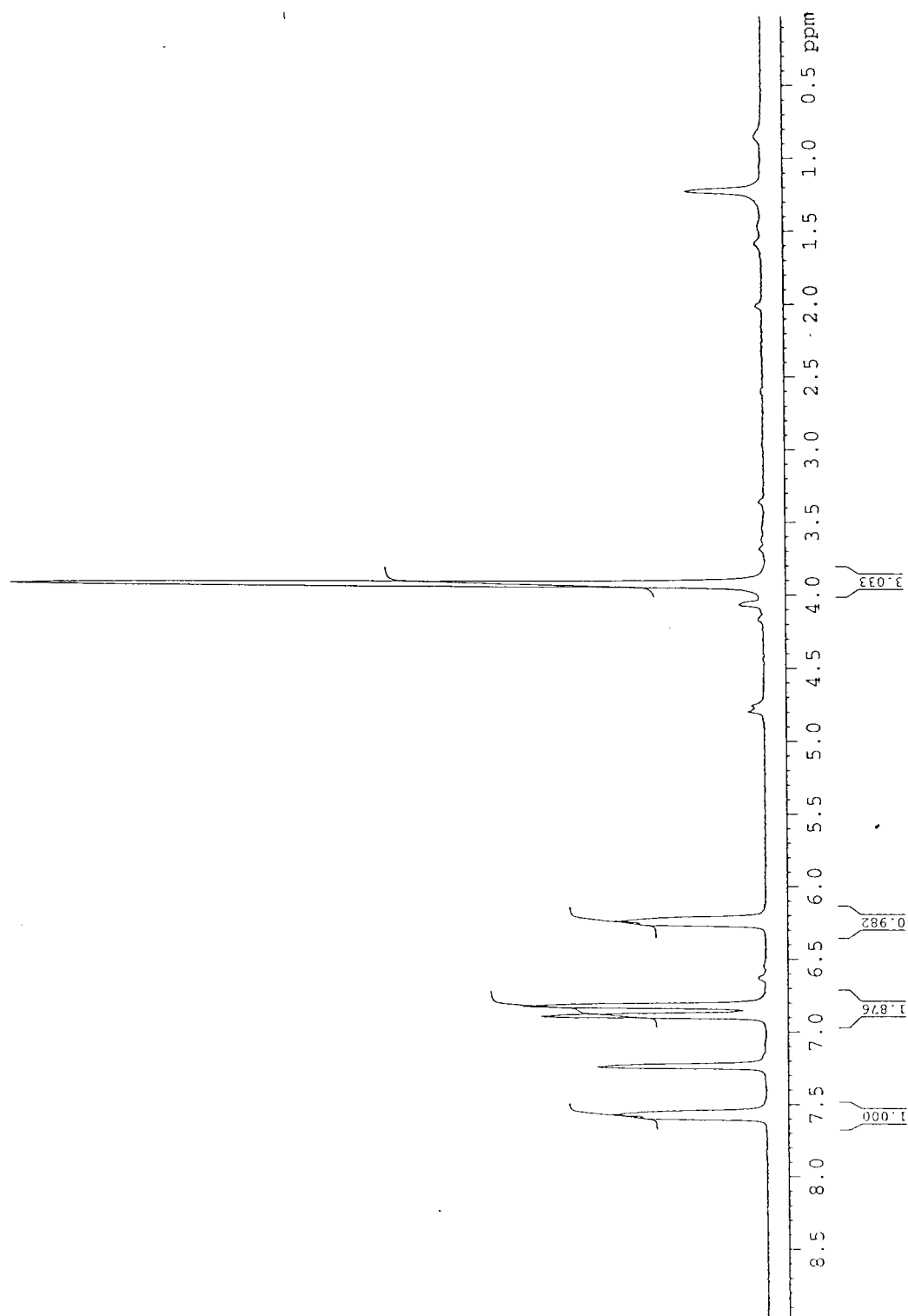


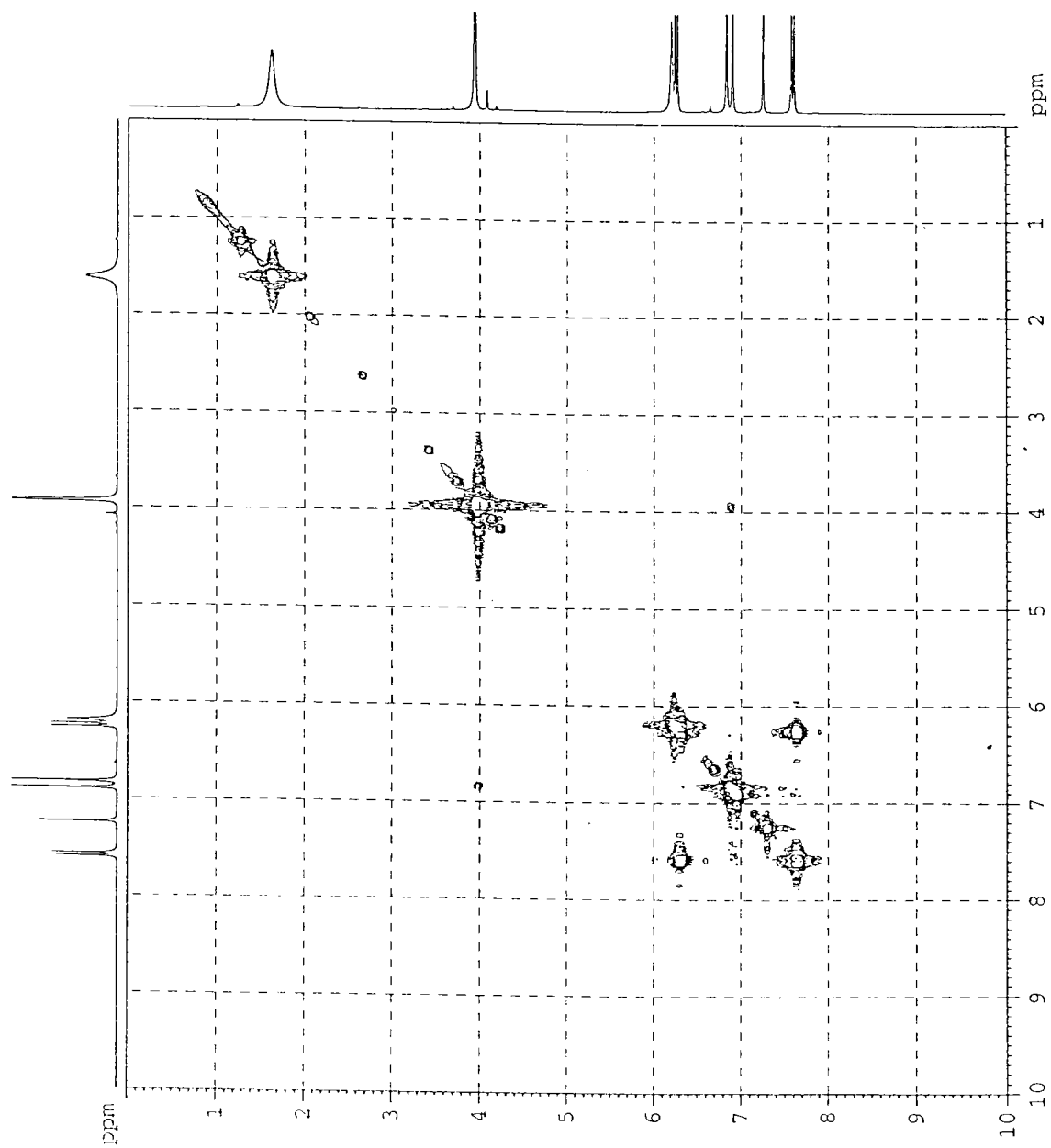


ภาพประกอบ 95 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ K

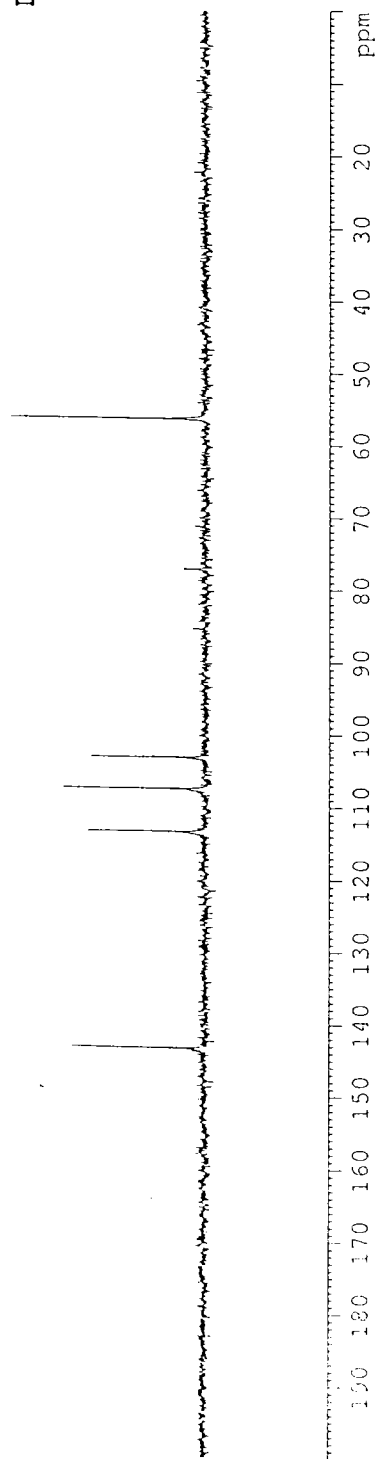


ภาพประกอบ 96 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ K

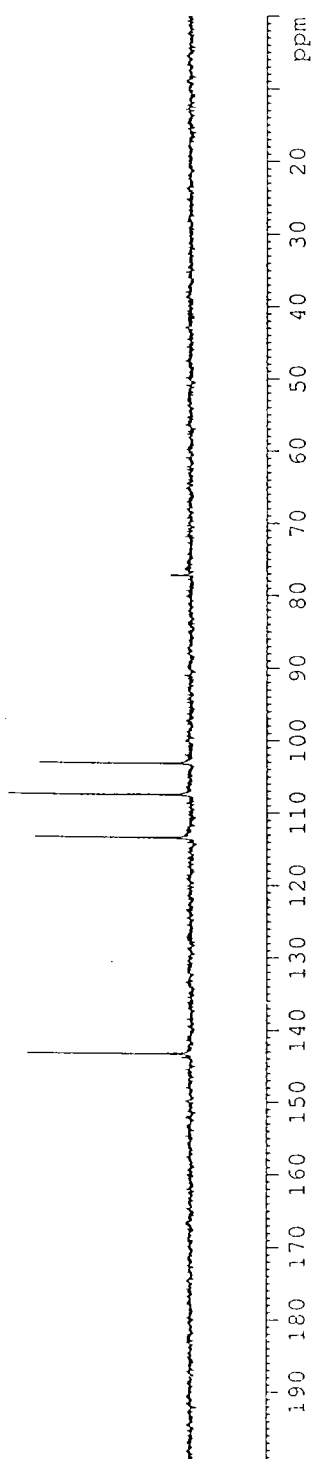
ภาพประกอบ 97 ^1H NMR D_2O exchange spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ K

ภาพประกอบ 98 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสารประกอบ K

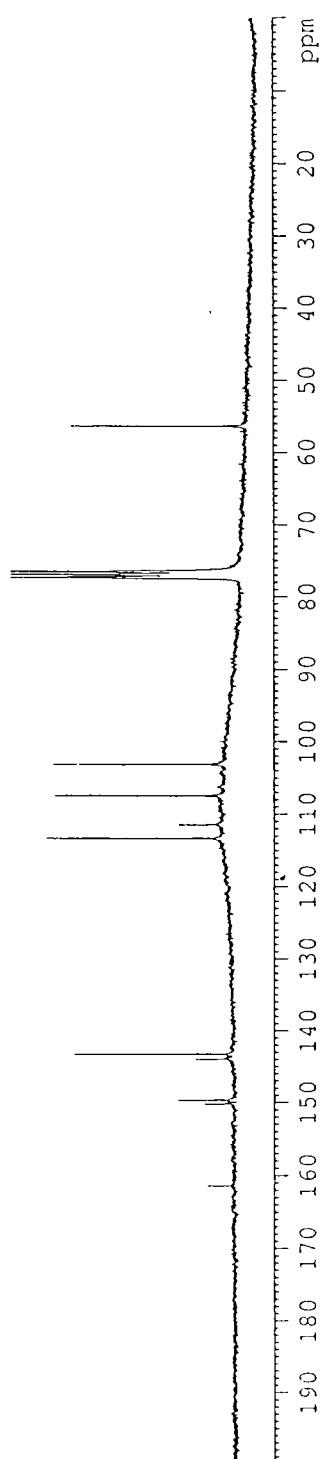
DEPT135



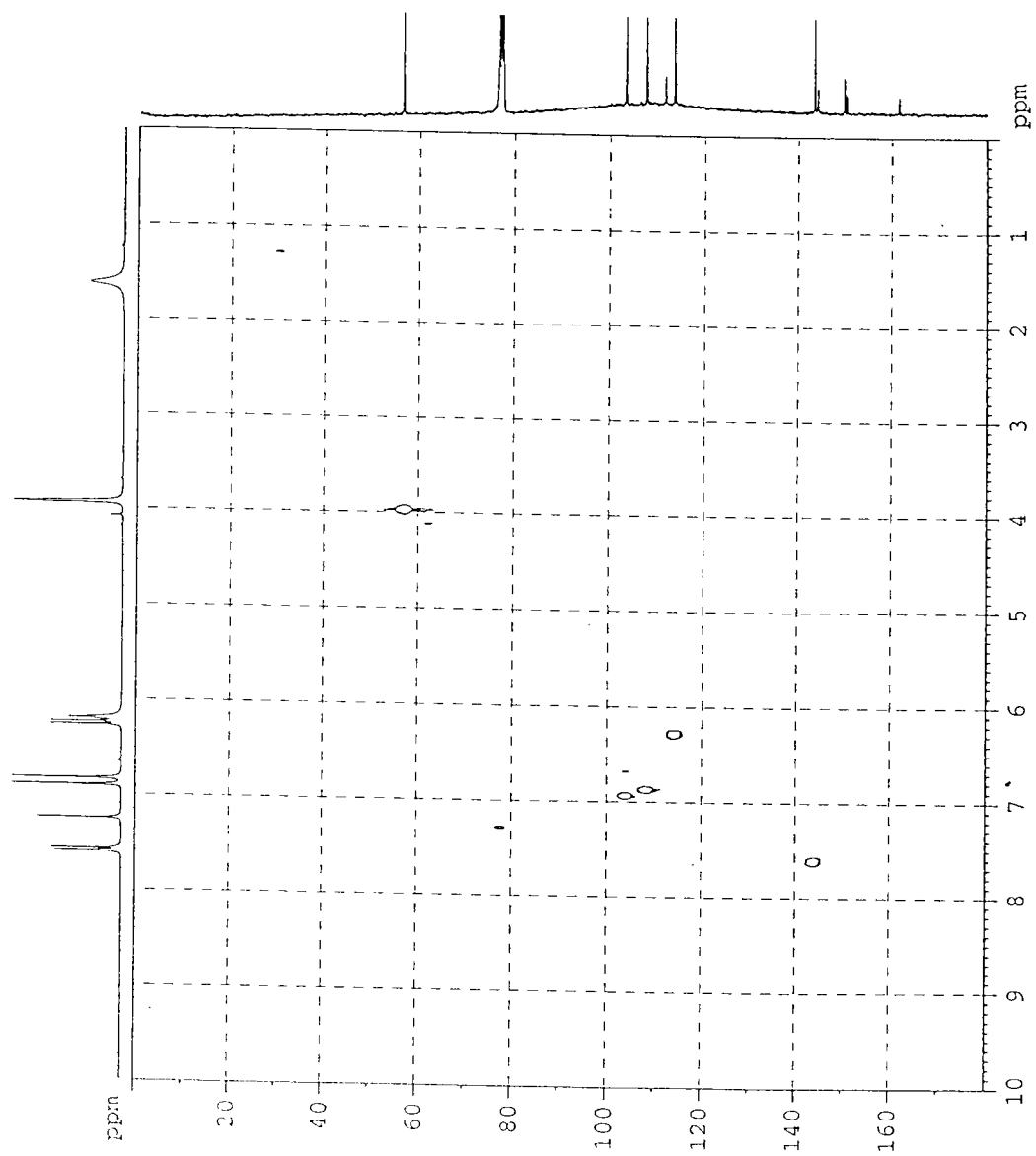
DEPT90



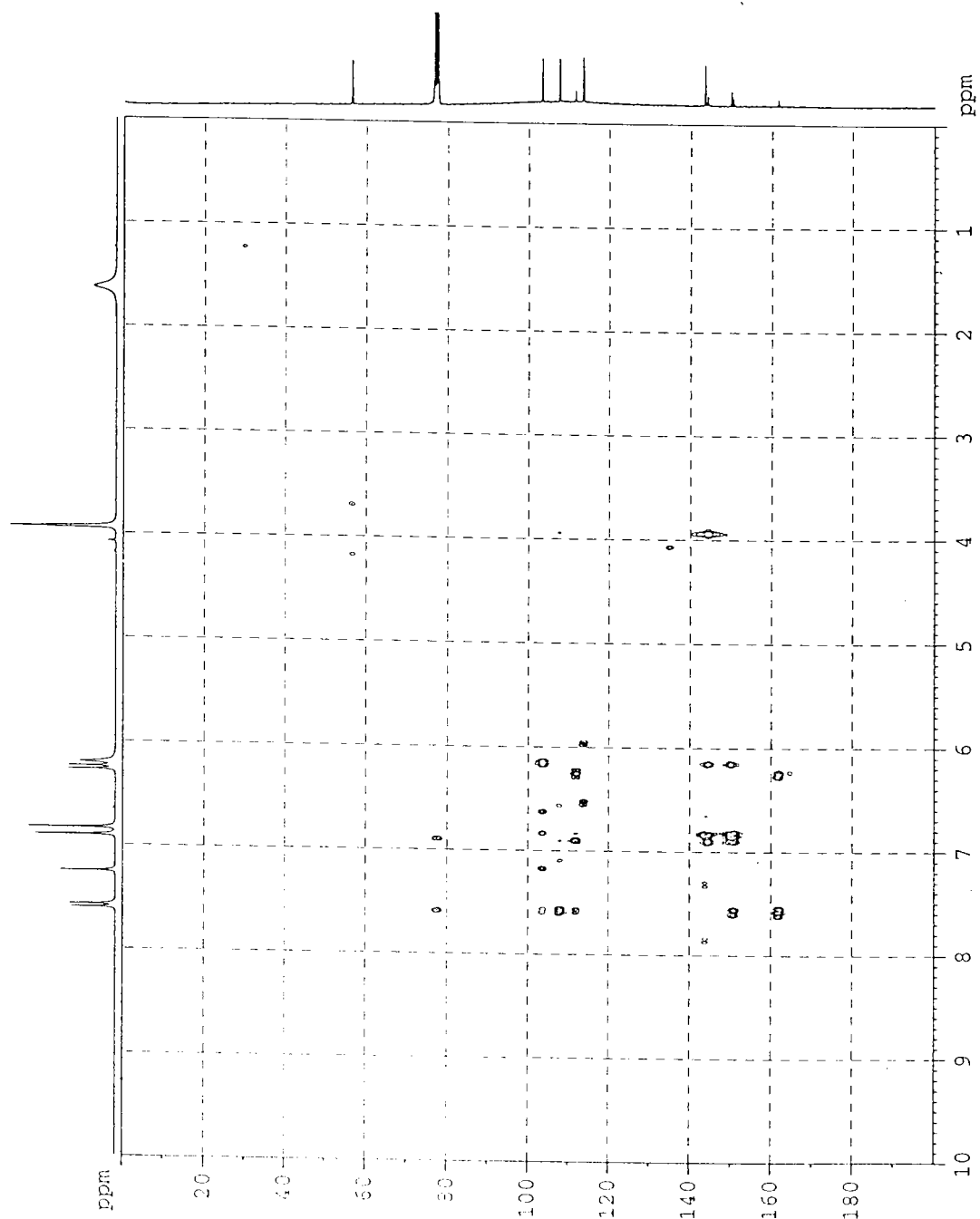
¹³C



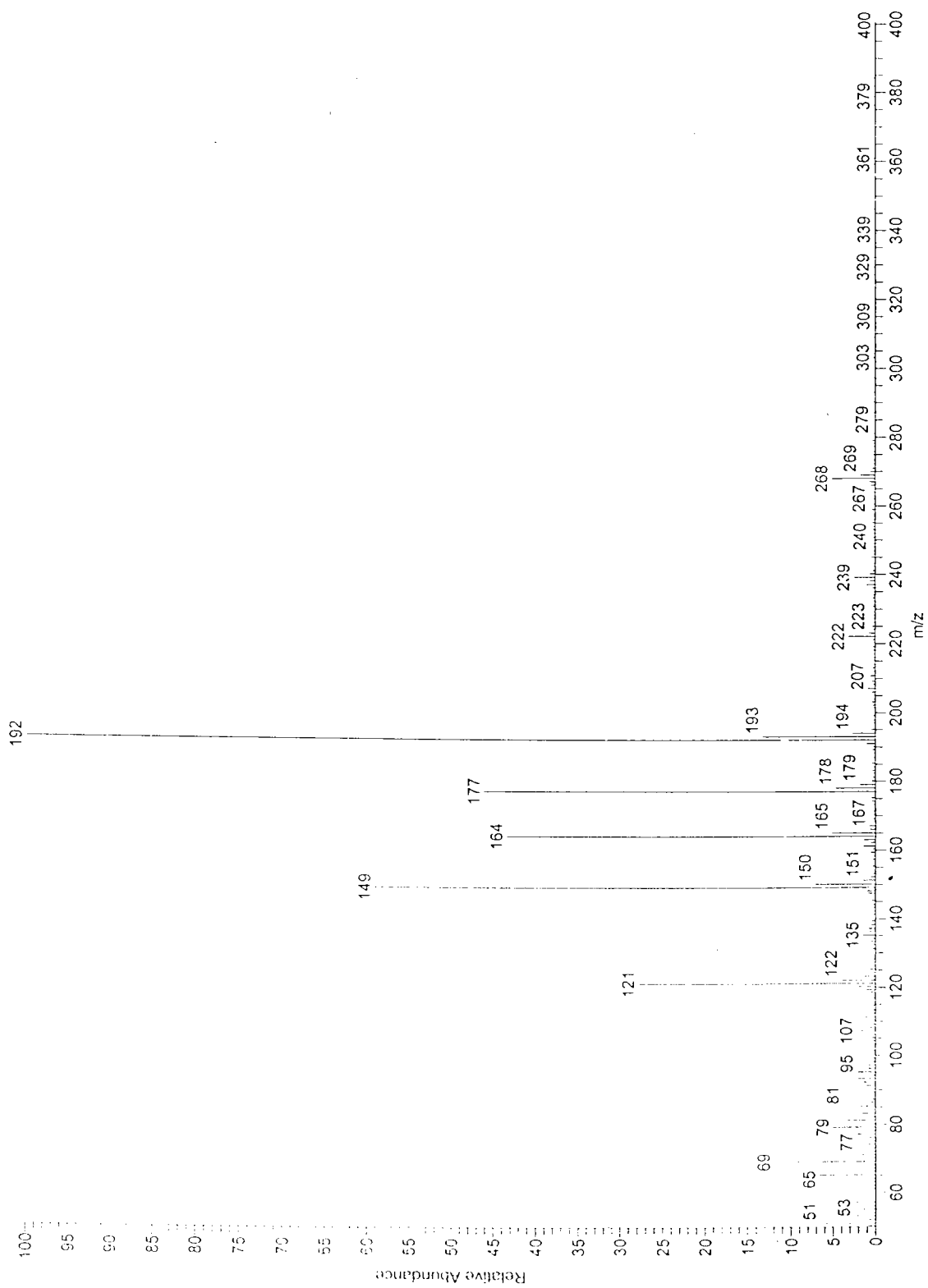
ภาพประกอบ 100 ¹³C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ K



ภาพประกอบ 101 HMQC spectrum ของสารประกอบ K



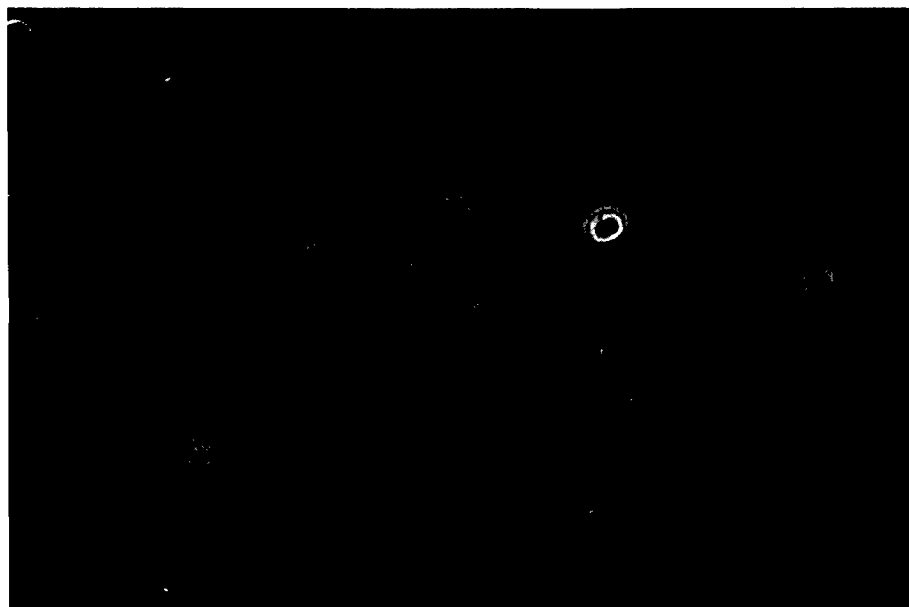
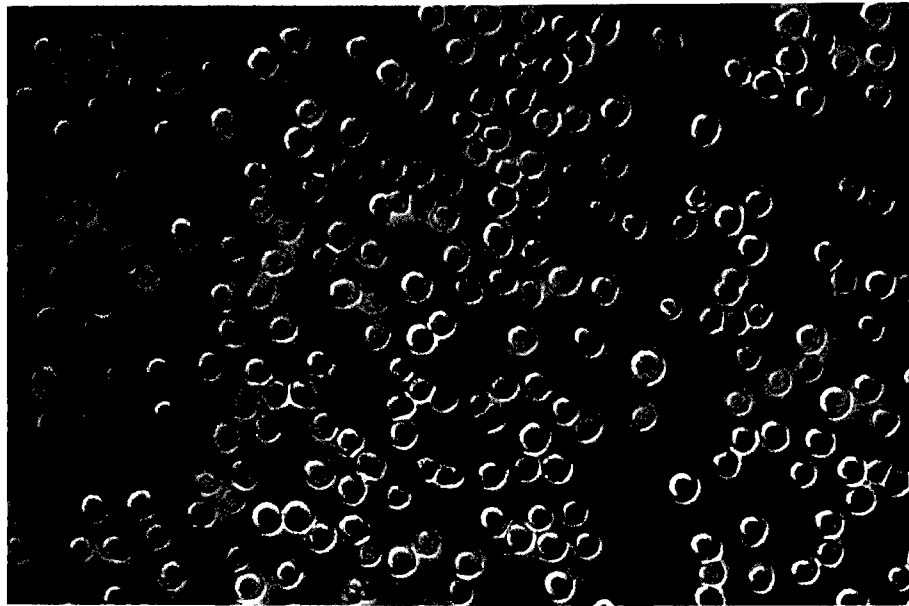
ภาพประกอบ 102 HMBC spectrum ของสารประกอบ K



ภาพประกอบ 103 Mass spectrum ของสารประกอบ K

ภาคผนวก ข

ภาพแสดงเซลล์กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



ภาพประกอบ 104 ลักษณะของเซลล์มะเร็งกลุ่มควบคุม(บน) และกลุ่มทดลอง(ล่าง)

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแยกสารและการตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของสารที่แยกได้

1. การเตรียม anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบมีปริมาณสารต่าง ๆ ต่อไปนี้

conc. sulfuric acid	8.00 mL
anisaldehyde	0.50 mL
methanol	85.00 mL
glacial acetic acid	10.00 mL

นำสารทั้งหมดผสมลงในบีกเกอร์เย็นจัดที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง คนสารละลายให้เข้ากันและเก็บสารที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 media

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด P-388 มีองค์ประกอบและปริมาณดังนี้

RPMI Medium 1640 powder	20.90 g
Sodium hydrogencarbonate	2.00 g
HEPES	3.00 g
Sodium penicillin G	0.50 mL
Streptomycin	1.00 mL

ละลาย RPMI Medium 1640 powder ในน้ำกลั่น คนตลอดเวลาจนสารละลายใส เติม Sodium hydrogencarbonate และ HEPES คนต่อจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับความเป็นกรด-เบส ด้วย HCl 1.0 M หรือ NaOH 1.0 M จนกระทั่งค่า pH อยู่ในช่วง 7.2 – 7.4 เติม Sodium penicillin G 0.50 mL และ Streptomycin 1.00 mL ปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองด้วย millipore filter เก็บสารละลายที่เตรียมได้ในตู้เย็น ก่อนใช้ให้เติม Newborn Carf Serum (NCS) โดยใช้ Newborn Carf Serum (NCS):อาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร

2. การเตรียม Trypan Blue Dye 4%

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบมีปริมาณสารต่าง ๆ ดังนี้

trypan blue	1.60 g
sodium chloride	3.24 g
potassium phosphate	0.24 g
methyl-p-hydroxy benzoate	0.20 g

ละลาย trypan blue sodium chloride potassium phosphate และ methyl-p-hydroxy benzoate ในน้ำกลั่น 900 mL นำไปต้มให้เดือดคนด้วยแท่งคนแม่เหล็กตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายเข้าด้วยกันทั้งหมด วัดความเป็นกรด-เบส และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2–7.4 ด้วย NaOH 1.0 M และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก ง

การคำนวณเซลล์ที่นับได้และการเจือจางเซลล์

การคำนวณเซลล์ที่นับได้และการเจือจางเซลล์

ตัวอย่าง การคำนวณเซลล์ที่นับได้และการเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.0×10^4 cell/mL ในการเตรียม stock cell suspension

จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 5 ช่องของ haematocytometer = 200 cell

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตร 1 ช่องของ haematocytometer} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{ลึก} \\ &= 0.10 \text{ cm} \times 0.10 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm} \\ &= 0.0001 \text{ cm}^3 \\ &= 10^{-4} \text{ mL} \end{aligned}$$

เซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue dye 2 เท่า

จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 5 ช่องของ haematocytometer = 200×2 cell

จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องของ haematocytometer = $200 \times 2/5$ cell

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตร 1 mL มีจำนวนเซลล์} &= 200 \times 2/5 \times 10^4 \text{ cell} \\ &= 8.0 \times 10^5 \text{ cell/mL} \end{aligned}$$

ต้องการเตรียมเซลล์ให้ได้ปริมาณ 5.0×10^4 cell/mL

$$\begin{aligned} \text{dilution number} &= 8.0 \times 10^5 \text{ cell/mL} / 5.0 \times 10^4 \text{ cell/mL} \\ &= 16 \end{aligned}$$

การเตรียม stock cell suspension ให้ได้เซลล์จำนวน 5.0×10^4 cell/mL จะต้องเจือจางเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์เป็น 16 เท่า นั่นคือ ต้องใช้เซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ (cell suspension) 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 15 ml จะได้ stock cell suspension ที่มีจำนวนเซลล์ตามต้องการ

ตัวอย่าง การผสม สารที่นำมาทดสอบ อาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ stock cell suspension ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่จะนำมาทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดเลี้ยงเซลล์หลังการผสม สารละลายที่ทดสอบ อาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ stock cell suspension จะมีปริมาตรเท่ากับ 5 mL จำนวนเซลล์ 5.0×10^4 cell และความเข้มข้นของ DMSO 0.5% โดยปริมาตร

ตาราง แสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น ของสารตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	อาหาร เลี้ยงเซลล์ (mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)
0	3.00	0.00	1.00	1.00
10	3.00	0.05	0.95	1.00
30	3.00	0.15	0.85	1.00
50	3.00	0.25	0.75	1.00
100	3.00	0.50	0.50	1.00

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้ในวันที่ 4 จะถูกวิเคราะห์เป็นร้อยละการอยู่รอดของเซลล์
เทียบกับกลุ่มควบคุม ถือว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้ในวันที่ 4 กลุ่มควบคุมร้อยละการอยู่รอด
ของเซลล์เป็น 100 ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ภาคผนวก จ
ความหมายอักษรย่อ

ความหมายอักษรย่อ

AcOH	acetic acid
A-549	human lung carcinoma
br s	broad singlet
n-BuOH	normal butanol
°C	degree celcius
¹³ C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
CC	Column Chromatography
CDCl ₃	deuteriochloroform
cm ⁻¹	reciprocal centimeters
COR-L23	large cell carcinoma
d	doublet
dd	doublet of doublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DLA	Dalton's lymphoma ascites tumour cells
DMSO	dimethyl sulfoxide
EAC	ehrllich ascites tumour cells
ED ₅₀	A concentration that inhibits 50% of the control cell growth
EI Ms	Electron Impact Mass Spectra
Et ₂ O	ethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FT IR	Fourier Transform Infrared Spectra
g	gram
μg	microgram
¹ H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
¹ H- ¹ H NMR	H-relayed correlated spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	¹ H-detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

H-411E	ret liver hepatoma cells
HCT-8	human colon carcinoma
Hep-G2	human hepatocellula carcinoma
HL-60	leukemia
HT-29	colon cancer
J	coupling constant
KB	human nasol pharyngeal carcinoma
LE	lewis lung carcinoma
L-929	mouse lung fibroblast cells
m	multiplet
M^+	molecular ion
MHz	mega hertz
mL	milliliter
m/z	mass to charge ratio
MeOH	methanol
MOR-P	adenocarcinoma
P-388	murine lymphocytic leukemia cell
PrOH	propanol
RPMI	human melanoma
ppm	parts per million
s	singlet
t	triplet
TLC	Thin Layer Chromatography
TE-671	human medulloblastoma

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายวัฒน์ ชูชนะกิจ
วันเดือนปีเกิด	29 กรกฎาคม 2508
สถานที่เกิด	อำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	387/146 หมู่ 1 ตำบลมะขามเตี้ย อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์ 2 ระดับ 6
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนมัธยมพัชรกิติยาภา 3 สุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2527	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี
พ.ศ. 2531	วท.บ. (ศึกษาศาสตร์) วิชาเอกเคมี คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
พ.ศ. 2547	กศ.ม. (เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ