

การศึกษาร่องรอยประกอบทางเคมีของสารสกัดไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตตจากลำต้น
พญารากดำ (*Diospyros rubra* Lec.)

ปริญญานิพนธ์
ของ
พุดิรัตน์ สารบรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2547
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

583-674

พ ๖290

๖.3

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตตจากลำต้น
พญารากดำ (*Diospyros rubra* Lec.)

บทคัดย่อ
ของ
พุดิรัตน์ สารบรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2547

พุดิรัตน์ สารบรรณ (2547), การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตต จากลำต้นพญารากดำ (*Diospyros rubra* Lec.). ปรินญาณพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะกรรมการควบคุม : รศ. ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล, ศ. ดร. สมศักดิ์ รุจิวัฒน์

พญารากดำ เป็นพืชสมุนไพรวงศ์ Ebenaceae ในแพทย์แผนไทยใช้ ด้านจุลชีพ รักษาวัณโรค ขับปัสสาวะ และระงับปวด ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาทางเคมีของสมุนไพรดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกสารได้ 6 ชนิด สารประกอบที่แยกได้จากสารสกัดไดคลอโรมีเทน มี 3 ชนิด ได้แก่ lupeol lupenone และ betulin และสารประกอบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต มี 3 ชนิด ได้แก่ lupeol acetate 28-acetylbetulin และ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside

STUDY ON CHEMICAL CONSTITUENTS FROM CRUDE DICHLOROMETHANE
AND CRUDE ETHYL ACETATE EXTRACTS OF *DIOSPYROS RUBRA* LEC.

AN ABSTRACT
BY
PUTTIRAT SARABAN

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Science Degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2004

Puttirat Saraban. (2004). Study on chemical constituents from crude dichloromethane and crude ethyl acetate extracts of *Diospyros rubra* Lec.. Master thesis, M.Sc. (Biological Chemistry). Bangkok : Graduate school, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Supaluk Prachayasittikul, Prof. Dr. Somsak Ruchirawat

Diospyros rubra Lec., a Thai medicinal plant belonging to family Ebenaceae, has been used as indigenous medicine for antimicrobial, antituberculosis, diuretic and analgesic actions. To date chemical constituents of the *Diospyros rubra* Lec. have not yet been reported. Our first investigation on its crude dichloromethane and crude ethyl acetate extracts led to the isolation of six compounds. Three isolates from crude dichloromethane extract are lupeol, lupenone and betulin. In addition, three isolated compounds from crude ethyl acetate extracts are lupeol acetate, 28-acetylbetulin and β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไคคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตดจากลำต้นพญารากดำ

(*Diospyros rubra* Lec.)

ของ

นางสาวพุดิรัตน์ สารบรรณ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพร หะวานนท์)

วันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ รุจิรวินน์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร. สุภลักษณ์ ประชญาสิทธิกุล ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ รุจิรวัฒน์ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่อง ในการทำปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล และ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึก mass spectrum และขอขอบพระคุณ ดร.हरभा प्रवृत्ति และคุณวิไลลักษณ์ ประชญาวารกร ที่ได้ช่วยแนะนำในการ พิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ

ขอกราบขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ รุจิรวัฒน์ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.) และทุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ นิสิตปริญญาโททุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคุณสมจิตต์ จัยวัฒน์ ที่ได้อุปการะค่าเล่าเรียนทั้งหมดตลอดจนเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณคุณสมบุรณ์ จัยวัฒน์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษามาโดยตลอด และขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และน้องสาวที่ได้ให้กำลังใจในการทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

พุดิรัตน์ สารบรรณ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับ <i>Diospyros rubra</i> Lec.....	3
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล <i>Diospyros</i> spp.....	3
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	17
แผนภูมิแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	17
วัสดุ สารเคมี และอุปกรณ์/เครื่องมือ.....	18
การสกัดสารจากลำต้นพญารากดำแห้ง การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์.....	19
การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	24
4 ผลการวิจัย.....	27
ผลการสกัดสารจากลำต้นพญารากดำ.....	27
ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2 และการทำให้บริสุทธิ์.....	27
ผลการแยกสารสกัด EtOAc และการทำให้บริสุทธิ์.....	31
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	36
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	36
5 สรุปผล อภิปราย.....	39
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารประกอบ 1.....	39
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารประกอบ 2.....	45
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารประกอบ 3.....	50

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
5 (ต่อ)	
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารประกอบ 4.....	55
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารประกอบ 5.....	60
การศึกษาสูตร โครงสร้างของสารประกอบ 6.....	66
 บรรณานุกรม.....	 71
 ภาคผนวก.....	 76
 อภิธานศัพท์.....	 81
 ประวัติย่อผู้วิจัย.....	 84

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล <i>Diospyros</i> spp	11
2 ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	27
3 ผลการแยกสารกลุ่ม C2.....	28
4 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.....	29
5 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.2.....	29
6 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.3.....	30
7 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.3.3.....	30
8 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.3.4.....	31
9 ผลการแยกสารสกัด EtOAc โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
10 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.....	32
11 ผลการแยกสารกลุ่ม E4.....	33
12 ผลการแยกสารกลุ่ม E4.4.....	34
13 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.....	34
14 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.2.....	35
15 ผลการแยกสารกลุ่ม E6.....	35
16 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 1.....	41
17 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMQC ของสารประกอบ 1.....	42
18 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMBC ของสารประกอบ 1.....	43
19 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 1 และ Lupeol.....	43
20 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 2.....	46
21 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMQC ของสารประกอบ 2.....	48
22 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMBC ของสารประกอบ 2.....	48
23 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 2 และ Lupenone.....	48
24 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 3.....	51
25 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMQC ของสารประกอบ 3.....	52
26 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMBC ของสารประกอบ 3.....	53
27 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 3 และ Betulin.....	53

บัญชีตาราง (ต่อ)

28	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 4.....	56
29	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMQC ของสารประกอบ 4.....	57
30	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMBC ของสารประกอบ 4.....	58
31	แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 4 และ Lupeol acetate.....	58
32	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 5.....	61
33	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMQC ของสารประกอบ 5.....	63
34	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ที่สัมพันธ์กับ HMBC ของสารประกอบ 5.....	63
35	แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 5 และ 28-acetyl-3-(<i>E</i>)-coumaroylbetulin	64
36	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 6.....	67
37	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR ของสารประกอบ 6 และ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside.....	68

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. พญารากดำ (<i>Diospyros rubra</i> Lec.).....	4
2. แสดงโครงสร้างในกลุ่ม triterpenoids จากพืชสกุล <i>Diospyros</i> spp.....	15
3. แสดงโครงสร้างในกลุ่ม naphthoquinone จากพืชสกุล <i>Diospyros</i> spp.....	16
4. แสดงโครงสร้างในกลุ่มอื่นๆ จากพืชสกุล <i>Diospyros</i> spp.....	17
5. แผนภูมิการแยกสารสกัดชั้น CH_2Cl_2	25
6. แผนภูมิการแยกสารสกัดชั้น EtOAc.....	26

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในสมัยเริ่มแรกมนุษย์ได้รู้จักนำเอาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ใกล้ตัว เช่น พืช สัตว์ และ แร่ธาตุต่าง ๆ มาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยการนำมาประกอบเป็นอาหาร ที่อยู่อาศัย เครื่องนุ่งห่ม และยารักษาโรค ดังนั้นพืชจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการดำรงชีวิตเพื่อความอยู่รอด และมีส่วนสำคัญในการใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค ประสบการณ์และการเรียนรู้ด้วยตัวเองและการบอกเล่าสืบทอดต่อกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ ทำให้มนุษย์รู้ว่าพืชใด หรือ ต้นไม้ชนิดใดใช้รักษาโรคได้ และในบางครั้งอาจอาศัยความรู้รูปร่างลักษณะของพืชว่ามีลักษณะเหมือนอวัยวะใดก็จะใช้รักษาอวัยวะนั้น (The signature doctrine) หรืออาศัยลักษณะของสีหรือรสชาติ เช่น สีแดงใช้รักษาเกี่ยวกับ โรคเลือด รสขมใช้รักษาเกี่ยวกับน้ำดี เป็นต้น เมื่อวิทยาการต่างๆก้าวหน้ามากขึ้นนักวิทยาศาสตร์ได้สกัดและแยกสารเคมีบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพร ทำให้เชื่อว่าสารเคมีที่สกัดนั้นเป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชสมุนไพรนั้นๆ (นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์ 2534 : 1) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์สารเคมีหลายชนิดขึ้นมาใช้เป็นยา แต่ด้วยยาสำคัญๆอีกมากมายหลายชนิดก็ยังสกัดได้จากพืชสมุนไพร ดังนั้น พืชสมุนไพรจึงเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติของตัวยาหลายชนิดที่ใช้กันในปัจจุบัน และยังเป็นแหล่งสำคัญของสารเคมีจำนวนมากที่อาจมีประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์และอุตสาหกรรม

พืชสกุล *Diospyros* spp. อยู่ในวงศ์ Ebenaceae ซึ่งมีมากกว่า 350 ชนิดทั่วโลก พบได้ในป่าเขตร้อนและเขตร้อนชื้น จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีการพบว่ามีสารเคมีหลายชนิดที่อยู่ในกลุ่ม triterpenoids, steroids, naphthoquinones, naphthalene, benzopyrones, hydrocarbons, lipids, amino acid, carotenoids และ sugar (Mallavadhani, Panda & Rao. 1998 : 901-951) ในส่วนของงานวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุลนี้ เช่น ต้น *Diospyros mespiliformis* (Host) ซึ่งมีสารในกลุ่ม naphthoquinones ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* ได้ในระดับที่ดีแต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ในระดับค่อนข้างต่ำ (Lajubutu, et al. 1995 : 346-350)

พญารากคำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Diospyros rubra* Lec. อยู่ในวงศ์ Ebenaceae เป็นสมุนไพรที่ใช้รักษาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย อาการปัสสาวะพิการ วัณโรคในลำไส้ วัณโรคปอด เป็นต้น (นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร 2541 : 237-238) ยังมีพืชในสกุล *Diospyros* spp. อีกหลายชนิดที่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านเช่น *Diospyros mollis* Griff (มะเกลือ) ใช้เป็นยาขับพยาธิ ตัวตืด พยาธิปากขอ เป็นต้น และ *Diospyros areolata* King & Gamble (มะพลับ) ใช้เป็นยาห้ามเลือด

ยาสมุนไพร และใช้กินแก้ท้องร่วง เป็นต้น (ลินา ผู้พัฒนางาน 2530 : 608-628) และเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาด้านเคมีของสมุนไพรพญารากดำ (*Diospyros rubra* Lec.) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบด้านเคมีของสมุนไพรดังกล่าว โดยคาดหวังว่าจะได้ข้อมูลทางเคมีเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในด้านอื่น เช่น ด้านเภสัชวิทยา และอาจพัฒนาใช้เป็นยาในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัด การแยกสารจากลำต้นพญารากดำและการทำสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัด dichloromethane และ สารสกัด ethyl acetate
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารบางชนิดที่แยกได้จากลำต้นพญารากดำ

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบวิธีการแยกสารและการทำสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีให้บริสุทธิ์จากลำต้นพญารากดำ
2. ทำให้ทราบสูตร โครงสร้างของสารบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากลำต้นพญารากดำ ซึ่งอาจเป็นสารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ อาจเป็นแนวทางการศึกษาเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

ขอบเขตการวิจัย

1. ใช้ส่วนลำต้นที่ตากแห้งของต้นพญารากดำ (*Diospyros rubra* Lec.) จากอำเภอบ้านดง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สูงจากระดับน้ำทะเล 170 เมตร
2. การสกัดสารจากลำต้นพญารากดำใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ
3. นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 ส่งทดสอบฤทธิ์ด้านมาลาเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
4. นำเฉพาะสารสกัด dichloromethane และ ethyl acetate มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟี และวิธีการตกผลึก
5. ศึกษาสูตร โครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) แมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

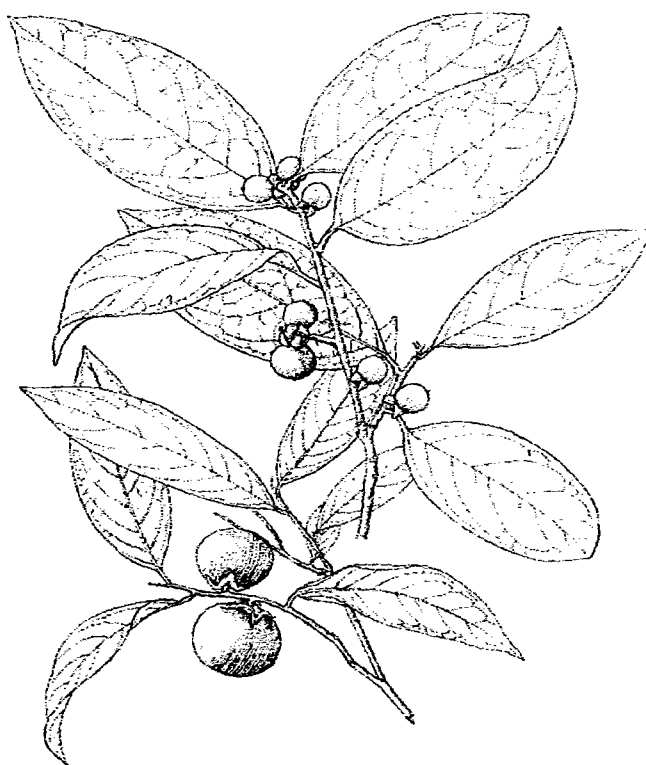
พญารากคำ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Diospyros rubra* Lec. อยู่ในวงศ์ Ebenaceae เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ สูงถึง 5 เมตร ลักษณะของใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับเป็นรูปขอบขนานถึงรูปใบหอก กว้างประมาณ 2 - 7 ซม. ยาวประมาณ 6 - 16 ซม. โคนใบมีลักษณะแหลมหรือมน ปลายใบจะมนแหลม ผิวใบมีลักษณะเรียบ ท้องใบจะมีขน ก้านใบยาวประมาณ 0.5 - 1 ซม. และมีขน ลักษณะของดอก จะแยกเพศอยู่กันคนละต้น โดยดอกตัวผู้จะออกเป็นลักษณะช่อสั้นๆ กลีบดอกจะเชื่อมติดกันเป็นรูปคนโท ส่วนดอกตัวเมียจะมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ ลักษณะของผล ผลสดจะมีรูปร่างคล้ายกระสวย กว้างประมาณ 1-2 ซม. ยาวประมาณ 1.25 ซม. ลักษณะเปลือกจะแข็งและมีกลีบเลี้ยงติดอยู่ (นันทวัน บุญยะประกฤษ และอรนุช โชคชัยเจริญพร 2541 : 237-238) (ภาพประกอบ 1)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล *Diospyros* spp.

โยชิฮิราและคณะ (Yoshihira, et al. 1971 : 2271-2277) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากผลแห้ง เปลือกลำต้นแห้ง และรากสดของต้น *Diospyros mollis* Griff (มะเกลือ) โดยนำผลแห้งมาสกัดด้วย chloroform ใช้เครื่อง soxhlet นำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ lupeol (1) และ taraxerol (2) และสารที่พบในกลุ่ม naphthoquinones คือ elliptinone (3) จากนั้นนำเปลือกลำต้นแห้งไปสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเดียวกันกับผลแห้งได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ lupeol (1) betulin acetate (4) lupeone (5) และสารในกลุ่ม naphthoquinones คือ elliptinone (3) และ mamegakinone (6) เมื่อนำรากสดมาสกัดด้วย chloroform นำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ควบคู่กับวิธี preparative TLC ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ betulin (7) และสารในกลุ่ม naphthalene คือ 4,5,8-trimethoxy-2-naphthaldehyde (8)

เจน และ ยาดาวา (Jain & Yadava. 1994 : 1070-1072) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากผลของต้น *Diospyros peregrina* โดยนำมาสกัดด้วย ethanol แยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ taraxerone (9) สารในกลุ่ม steroids คือ β -sitosterol (10) และสารในกลุ่มอื่นคือ gallic acid (11) ส่วนสารชนิดใหม่ในกลุ่ม triterpenoids ที่แยกได้โดยวิธีการตกผลึกคือ lup-20(29)-en-3 α ,27diol หรือ peregrinol (12)

ลาจูบุตู (Lajubutu. 1994 : 477) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากรากของต้น *Diospyros tricolor* Hiern โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether ใช้เครื่อง soxhlet นำสารสกัดที่ได้ไปแยกและทำให้



ภาพประกอบ 1 พญารากดำ (*Diospyros rubra* Lec.)

บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และวิธีการตกผลึกได้สารในกลุ่ม naphthoquinones คือ diosquinone (13) และนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่ความเข้มข้นประมาณ 1-5 $\mu\text{g/mL}$ เช่น *Staphylococcus aureus* NCTC6571, *Staphylococcus aureus* E₃T, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* NCTC8236, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Bacillus cereus* และ *Corynebacteria diphtheria* var. *mitis*. สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* NCTC7001, *Escherichia coli* KL16, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6750, *Klebsiella edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes* ATCC3048, *Proteus mirabilis* ATCC14223, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia species*, *Haemophilus influenzae* และ *Salmonella typhimurium* พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งได้ในระดับค่อนข้างต่ำ โดยใช้สารในปริมาณความเข้มข้น 15-60 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับ penicillin, ampicillin, tetracycline, streptomycin และ sulphamethoxazole

เรซีโอ และคณะ (Recio, et al. 1995 : 9-12) ได้ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารกลุ่ม triterpenoids จากต้น *Diospyros lecomelas* โดยนำใบของต้น *Diospyros lecomelas* มาสกัดด้วย dichloromethane และ methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งจากนั้นนำเฉพาะสารสกัดชั้น dichloromethane มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และวิธี gel filtration แยกได้สาร betulin (7) betulinic acid (14) และ ursolic acid (15) และนำสารประกอบที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของหนู โดยทดสอบกับ 12-O-tetradecanoylphorbol acetate (TPA) พบว่า betulinic acid (14) สามารถยับยั้งการอักเสบได้มากถึง 86.2% betulin (7) สามารถยับยั้งได้ 81.3% และ ursolic acid (15) สามารถยับยั้งได้ 73.4% ส่วนการทดสอบกับ ethyl phenylpropiolate (EPP) พบว่า betulin (7) สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 45.5 % ส่วน betulinic acid (14) และ ursolic acid (15) ยับยั้งได้เพียง 30.3 % จากนั้นนำสารประกอบที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบที่เท้าของหนู และใช้ร่วมกับตัวยับยั้ง progesterone steroid ที่ได้จากธรรมชาติ, actinomycin D และ cycloheximide ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง glucocorticoid และยับยั้ง mRNA หรือยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน พบว่า สารประกอบที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด สามารถออกฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดี แต่เมื่อใช้ร่วมกับตัวยับยั้ง จะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดน้อยลง

ลาจูบูตูและคณะ (Lajubutu, et al. 1995 : 346-350) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากรากของต้น *Diospyros mespiliformis* (Hostch) โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether และ chloroform ใช้เครื่อง soxhlet นำสารสกัดชั้น petroleum ether มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ α -amyrin (16) สารในกลุ่ม steroids คือ β -sitosterol (10) และสารในกลุ่ม naphthoquinones คือ plumbagin (17) ส่วนของสารสกัด chloroform นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์

โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สาร diosquinone (13) และนำสารที่แยกได้ไปศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าสาร diosquinone (13) และ plumbagin (17) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* NCTC6571 และ *Staphylococcus aureus* E₃T ได้ โดยใช้สารในปริมาณความเข้มข้น 3-30 µg/mL และ 400 µg/mL ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* KL16 และ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6750 นั้น diosquinone (13) ออกฤทธิ์ได้ที่มีความเข้มข้นประมาณ 15-16 µg/mL ส่วน plumbagin (17) ที่ความเข้มข้น 600 µg/mL จึงสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* KL16 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6750 โดยเปรียบเทียบกับ penicillin streptomycin gentamycin และ ampicillin

สุทธิไวกิจและคณะ (Sutthivaiyakit, et al. 1995 : 295) ได้ศึกษาการแยกสารประกอบจากเปลือกแห้งของต้น *Diospyros rhodocalyx* (ตะโกนา) โดยสกัดด้วย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ใช้เครื่อง soxhlet และนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ lupeol (1) taraxerol (2) lupenone (5) betulin (7) betulinic acid (14) taraxeryl acetate (18) และสารในกลุ่ม steroids คือ stigmast-4-en-3-one (19) และ stigmast-4-en-3-one 1-O-ethyl-β-D-glucopyranoside (20)

พักนิกาและคณะ (Paknikar, et al. 1996 : 931-933) ได้ศึกษาการแยกสารประกอบจากรากของต้น *Diospyros kaki* Thunb var. *sylvestris* Makino และ *Diospyros kaki* Thunb โดยนำรากของต้น *Diospyros kaki* Thunb var. *sylvestris* Makino มาสกัดด้วย methanol และนำสารสกัด methanol มาทำการแบ่งส่วนการละลาย (partition) ระหว่าง hexane-น้ำ นำสารสกัดชั้น hexane มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ lupeol (1) สารในกลุ่ม naphthoquinones คือ 7-methyljuglone (21) และสารในกลุ่ม benzopyrones คือ bis-4-hydroxy-5-methylcoumarin หรือ gerberinol (22) กลุ่มวิจัยนี้ยังได้สกัดสารจากรากต้น *Diospyros kaki* Thunb ด้วย chloroform แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และวิธีการตกผลึกได้สารใหม่ที่อยู่ในกลุ่ม benzopyrones คือ 11-methylgerberinol (23)

กู ชาง และ กู (Kuo, Chang & Kuo : 1997 : 1135-1137) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากแก่นไม้ของต้น *Diospyros maritima* โดยนำมาสกัดด้วย ethanol แล้วนำสารสกัด ethanol มาแบ่งส่วนการละลายใน hexane : น้ำ จากนั้นนำสารละลาย hexane ที่ได้มาแบ่งส่วนการละลายอีกครั้งใน BuOH : น้ำ ได้สารสกัด BuOH แล้วนำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบสารใหม่ในกลุ่ม triterpenoids คือ 3-(E)-Feruloylbetulin (24) และ 28-acetyl-3-(E)-coumaroylbetulin (25) และยังพบสารในกลุ่มเดียวกันคือ taraxerol (2) betulin (7) และ erythrodiol (26)

กูและคณะ (Kuo, et al . 1997 : 363-365) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากลำต้นของต้น *Diospyros maritima* Blume โดยนำมาสกัดด้วย ethanol แล้วนำสารสกัด ethanol ที่ได้มาสกัดต่อด้วย hexane แล้วนำสารสกัดชั้น hexane ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography HPLC) พบสารใหม่ในกลุ่ม triterpenoids ที่เป็น coumaric acid ester ของ lupeol คือ dioslupecin A (27) และยังพบสารในกลุ่มเดียวกันคือ lupeol (1) lupeone (5) และ taraxerone (9) ส่วนสารในกลุ่ม steroids ที่แยกได้คือ β -sitosterol (10) stigmast-4-en-3-one (19) และ ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (28) และสารในกลุ่ม naphthoquinones ได้แก่ plumbagin (17) 8'-hydroxyisodiospyrin (29) และ isodiospyrin (30) นำสารที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ hepatoma (HEPA-3B) nasopharynx carcinoma (KB) colon carcinoma (COLO-205) และ cervical carcinoma (HELA) พบว่าสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมาก คือ สาร plumbagin (17) และ isodiospyrin (30) โดย plumbagin (17) มีฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ HEPA-3B KB COLO-205 HELA มีค่า $ED_{50} = 0.87$ 3.27 0.56 และ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และ isodiospyrin (30) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด มีค่า $ED_{50} = 0.25$ 1.81 0.13 และ 0.27 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

คอสตาและคณะ (Costa, et al. 1998 : 391) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากเปลือก รากของ ต้น *Diospyros chamaethamnus* โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether ใช้เครื่อง soxhlet แล้วนำสารสกัด petroleum ether มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ควบคู่กับวิธี preparative TLC ได้สารในกลุ่ม naphthoquinones คือ 7-methyljuglone (21) 2-methylnaphthazarin (31) biramentaceone (32) mamegakinone (6) xylopyrin (33) และ diospyrin (34) โดย 2-methylnaphthazarin (31) biramentaceone (32) และ mamegakinone (6) เป็นสารที่พบครั้งแรกในพืชชนิดนี้

คานและเร็กกิกา (Khan & Rwekika. 1998 : 2501-2503) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากเปลือก รากของต้น *Diospyros greeniwayi* โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether และสกัดต่อด้วย chloroform ตามลำดับ นำสารสกัดในชั้น petroleum ether มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ lupeol (1) ส่วนสารสกัด chloroform นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และวิธีการตกผลึกได้สารในกลุ่ม naphthoquinones คือ 7-methyljuglone (21) และ diosindigo A (35) และได้สารใหม่คือ 5,5'-dihydroxy-2,7'-dimethyl-3,8'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone (36) หรือเรียกว่า habibone

ลี บิล และวู (Li, Bijl & Wu. 1998 : 817-820) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากกิ่งก้านของต้น *Diospyros lycioides* โดยนำมาทำการ refluxed ด้วย methanol ระเหยเอาตัวทำละลายออกได้

สารสกัด methanol นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารใหม่ที่เป็น binaphthalenone glycoside คือ 1',2-binaphthalen-4-one-2',3-dimethyl-1,8'-epoxy-1,4',5,5',8,8'-hexahydroxy-8-*O*- β -glucopyranosyl-5'-*O*- β -xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (37) และ 1',2-binaphthalen-4-one-2',3-dimethyl-1,8'-epoxy-1,4',5,5',8,8'-hexahydroxy-5',8-di-*O*- β -xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (38) และนำสารที่แยกได้ไปศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก พบว่ายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sanguis* โดยใช้ความเข้มข้นของสารประมาณ 1 mg/mL แต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *Porphyromonas gingivalis* และ *Prevotella intermedia*

ฮิเกะ โอกิฮารา และ โยกิ (Higa, Ogihara & Yogi. 1998 : 1189-1193) ได้ศึกษาการแยกสารประกอบจากผลสด ใบสด และกิ่งก้านของต้น *Diospyros maritima* Blume โดยนำผลสดมาสกัดด้วย ethanol เป็นเวลา 3 เดือน นำสารสกัดชั้น ethanol มาทำการแบ่งส่วนการละลาย ระหว่าง chloroform-น้ำ นำสารสกัดชั้น chloroform มาระเหยให้แห้งและละลายด้วย benzene ที่อุ่นจากนั้นนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ควบคู่กับวิธี preparative TLC ได้สารใหม่ในกลุ่ม naphthoquinones 3 ชนิด คือ 3-bromoplumbagin (39) ethylidene-6,6'-biplumbagin (40) และ 3-(2-hydroxyethyl)plumbagin (41) และยังพบสารในกลุ่มเดียวกันคือ elliptinone (3) plumbagin (17) 3-chloroplumbagin (42) 3-methylplumbagin (43) droserone (44) และ maritnone (45) ส่วนสารในกลุ่ม triterpenoids ที่พบคือ lupeol (1) lupenone (5) betulin (7) betulinic acid (14) friedelin (46) oleanolic acid (47) abbeokutone (48) 3 α ,16 α ,17-trihydroxykaurane (49) และพบสารในกลุ่ม benzopyrones คือ scopoletin (50) สำหรับใบสดและกิ่งก้านของพืชดังกล่าวได้นำมาสกัดและแยกสารประกอบโดยใช้วิธีเดียวกันกับการสกัดและการแยกสารประกอบจากผลสดทุกขั้นตอนพบว่าส่วนของใบสดแยกได้สารในกลุ่ม triterpenoids คือ lupeol (1) lupenone (5) betulin (7) betulinic acid (14) friedelin (46) oleanolic acid (47) abbeokutone (48) 3 α ,16 α ,17-trihydroxykaurane (49) β -amyrin (51) glutinol (52) scopoletin (50) และ vanillic acid (53) ส่วนของกิ่งก้านพบสาร lupeol (1) betulin (7) betulinic acid (14) oleanolic acid (47) abbeokutone (48) 3 α ,16 α ,17-trihydroxykaurane (49) scopoletin (50) และนำสารที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทดสอบความเป็นพิษต่อปลาขนาดเล็ก (*Poecilia (Lebites)-reticulata* PETERS) พบว่าสารในกลุ่ม naphthoquinones ทุกชนิดดังกล่าวข้างต้นยกเว้น droserone (44) และสารในกลุ่ม triterpenoids คือ oleanolic acid (47) แสดงความเป็นพิษค่อนข้างสูงโดยใช้สารในปริมาณ ≤ 2.7 ppm และได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาด (*Lectuca sativa* L. var. Great Lakes) พบว่าสารในกลุ่ม naphthoquinones มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาดได้ถึง 100% และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราพบว่าสารในกลุ่ม

naphthoquinones มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีโดยสามารถลดรัศมีการเจริญของเชื้อราได้ประมาณ ≤ 15 mm ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g}/\text{disc}$ เมื่อเทียบกับ *penicillium citrinum* จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 3 วิธีพบว่า plumbagin (17) มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด

กอนโด และคณะ (Gondo, et al. 1999 : 878-881) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจาก ก้านใบของต้น *Diospyros Kaki* Thumb โดยนำมาสกัดที่อุณหภูมิห้องด้วย methanol ได้สารสกัด methanol นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ Sephadex LH-20 เป็นตัวดูดซับ ได้สารใหม่ที่เป็น naphthalene glycoside คือ 7-methyl-1,4,5-trihydroxynaphthalene 4-O-(6'-O- β -xylopyranosyl)- β -glucopyranoside (54)

คาน และ เร็กกิกา (Khan & Rwekika. 1999 : 143-146) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากเปลือกกรากของต้น *Diospyros mafiensis* โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether และสกัดต่อด้วย chloroform ตามลำดับ นำเฉพาะสารสกัดชั้น chloroform มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารในกลุ่ม naphthoquinones คือ diosquinone (13) และนำส่วนที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์มาตกผลึก ได้สารใหม่ คือ 6',8'-bisdiosquinone (55)

แซง และ กู (Chang & Kuo. 1999 : 309-310) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากลำต้นของต้น *Diospyros maritima* Blume โดยนำมาสกัดด้วย ethanol และระเหยให้แห้งนำไปทำการแบ่งส่วนการละลายระหว่าง น้ำ-hexane จากนั้นนำสารสกัดชั้นน้ำมาทำการแบ่งส่วนการละลายอีกครั้งกับ butanol ได้สารสกัดชั้น butanol นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงได้สารใหม่ในกลุ่ม triterpenoids คือ 3-(E)-coumaroylbetulinaldehyde (56) และ 3-(E)-coumaroyl-28-palmitoylbetulinaldehyde (57)

ลิขิตวิทายาวูธ และ คณะ (Likhitwitayawuid, et al. 1999 : 754-756) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากกรากของต้น *Diospyros montana* (มะเกลือป่า) โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ นำสารสกัดชั้น ethyl acetate ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และวิธีการตกผลึกได้สารในกลุ่ม naphthoquinones คือ diospyrin (34) และนำส่วนที่แยกได้แต่ยังไม่บริสุทธิ์ไปแยกต่อโดยวิธี gel filtration ได้สารในกลุ่ม naphthalene คือ 5-hydroxy-4-methoxy-2-naphthaldehyde (58) และนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียพบว่า มีฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ได้ในระดับต่ำโดย diospyrin (34) และ 5-hydroxy-4-methoxy-2-naphthaldehyde (58) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,500 และ 10,000 ng/mL ตามลำดับ

แซง และ กู (Chang & Kuo. 2000 : 1211-1214) ได้ศึกษาและแยกสารประกอบจากลำต้นของต้น *Diospyros maritima* โดยนำมาสกัดด้วย ethanol และระเหยให้แห้งนำไปทำการแบ่งส่วนการละลายระหว่าง hexane และน้ำ จากนั้นนำชั้น hexane มาทำการแบ่งส่วนการละลายอีกครั้งกับ

butanol : น้ำ ได้สารสกัด butanol นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงได้สารใหม่ในกลุ่ม triterpenoids คือ diospyrolide (59) diospyrolidone (60) diethyl (2R)-malate (61) 3-(E)-coumaroylbetulin-28-yl ethyl nonanedioate (62) และ 3-(E)-coumaroylbetulin-28-yl ethyl succinate (63) และ 3-(E)-coumaroyl betulin-28-yl ethyl (2R)-2-hydroxysuccinate (64)

ครองสกุล และ คณะ (Trongskul, et al. 2003 : 221-225) ได้ศึกษาฤทธิ์ระงับปวด ขับปัสสาวะ และฤทธิ์ด้านการอักเสบ จากต้น *Diospyros variegata* Kruz. หรือ ต้นพญารากดำ โดยนำลำต้น *Diospyros variegata* Kruz. มาสกัดด้วย methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้มาระเหยให้แห้งนำไปทำการแบ่งส่วนการละลายระหว่าง hexane และน้ำ ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง รวมสารสกัด hexane ที่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขับปัสสาวะ และฤทธิ์ด้านการอักเสบ ในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวด แบ่งเป็น 3 วิธีคือ วิธีการทดสอบด้วยกรดแอซิติก (acetic acid-induced withing) การทดสอบการบิดหาง (tail-flick test) และการทดสอบด้วยฟอร์มาลิน (formalin test) พบว่าในการทดสอบด้วย กรดแอซิติก เมื่อใช้ morphine 10 mg/kg สามารถออกฤทธิ์ระงับปวดได้ 100% ส่วนสารสกัด hexane และ aspirin ใช้ปริมาณสาร 150 mg/kg ออกฤทธิ์ระงับปวดได้ 93 และ 91 % และในการทดสอบการบิดหางพบว่า สารสกัด hexane และ aspirin ออกฤทธิ์ได้เพียง 21 และ 16% ส่วนการทดสอบด้วยฟอร์มาลินนั้นจะแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ การทดสอบในระยะ early phase และ late phase พบว่า ในระยะ early phase สารสกัด hexane และ aspirin ออกฤทธิ์ได้เท่ากันคือ 38 % ส่วนในระยะ late phase สารสกัด hexane และ aspirin ออกฤทธิ์ได้ 73 และ 72 % ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบที่หูของหนูจะใช้ 2 วิธีคือ ethyl phenylpropionate-induced (EPP) และ arachidonic acid-induced (AA) โดยการทดสอบแบบ EPP-induced จะใช้ phenylbutazone 1 mg ต่อ 1 หนู และใช้สารสกัดชั้น hexane 4 mg ต่อ 1 หนู นำมาวัดที่เวลา 15 30 60 และ 120 นาที พบว่า phenylbutazone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ 55% 52% 52% และ 51% ตามลำดับ ส่วนสารสกัด hexane สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ 58% 60% 58% และ 55% ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัด hexane จึงมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ phenylbutazone (ตัวยับยั้ง cyclooxygenase) ส่วนการทดสอบแบบ AA-induced นั้นใช้ phenylbutazone 1 mg ต่อ 1 หนู phenidone 2 mg ต่อ 1 หนู และ สารสกัด hexane 4 mg ต่อ 1 หนู นำมาวัดที่เวลา 15 30 60 และ 120 นาที พบว่า phenylbutazone ออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ 25% 0% 8% และ 2% ตามลำดับ phenidone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ 39% 47% 56% และ 55% ตามลำดับ และสารสกัด hexane สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ 26% 41% 52% และ 50% ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ขับปัสสาวะในหนู นั้นจะใช้สารสกัด hexane และ aspirin 150 mg/kg ฉีดเข้าไปในหนูหลังจาก 18 ชั่วโมง นำมาวัดที่เวลา

30 60 90 120 นาที พบว่า สารสกัด hexane สามารถออกฤทธิ์ขับปัสสาวะ ได้ดีและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ aspirin

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล *Diospyros* spp. สามารถสรุปได้ในตาราง 1 และแสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารในกลุ่มต่างๆ ดังภาพประกอบ 2 3 และ 4

ตาราง 1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล *Diospyros* spp.

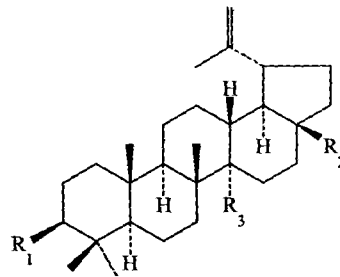
ชื่อพืช	ส่วน	สารที่พบ			ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
		triterpenoids	napthoquinones	กลุ่มอื่นๆ		
<i>Diospyros mollis</i> Griff (มะเกลือ)	ผล	(1),(2)	(3)	-	-	โยชิอิระและคณะ
	เปลือก	(1),(4),(5)	(3),(6)	-	-	
	ราก	(7)	-	(8)	-	
<i>Diospyros peregrina</i>	ผล	(9),(12)	-	(10),(11)	-	เจนและชาดาวา
<i>Diospyros tricolor</i> Hiern	ราก	-	(13)	-	ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก	ลาจูบูตู
<i>Diospyros lecomelas</i>	ใบ	(7),(14),(15)	-	-	ต้านการอักเสบ	เรจิโอและคณะ
<i>Diospyros mespiliformis</i> . (Hostch)	ราก	(16)	(13),(17)	(10)	ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก	ลาจูบูตู และคณะ
<i>Diospyros rhodocalyx</i> (ตะโกนา)	เปลือก	(1),(2),(5),(7),(14),(18)	-	(19),(20)	-	สุทธิไวยกิจและคณะ
<i>Diospyros kaki</i> Thunb var. <i>sylvestris</i> Makino และ <i>Diospyros kaki</i> Thunb	ราก	(1)	(21)	(22),(23)	-	พักนิกาและคณะ

ตาราง 1 (ต่อ)

ชื่อพืช	ส่วน	สารที่พบ			ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
		triterpenoids	napthoquinones	กลุ่มอื่นๆ		
<i>Diospyros maritima</i>	แก่น	(2),(7),(24) (25),(26)	-	-	-	ดู แสง และ ฤ
<i>Diospyros maritima</i> Blume	ลำต้น	(1),(5),(9), (27)	(17),(29),(30)	(10),(19), (28)	ต้านความ เป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง	ดูและคณะ
<i>Diospyros chamaethamnus</i>	เปลือกกราก	-	(6),(21),(31), (32),(33),(34)	-	-	คอสดาและ คณะ
<i>Diospyros greeniwayi</i>	เปลือกกราก	(1)	(6),(21),(31), (32),(33),(34)	-	-	คานและ เร็กกิกา
<i>Diospyros lycioides</i>	กิ่งก้าน	-	-	(37),(38)	ยับยั้ง แบคทีเรีย แกรมบวก	ลี บิล และวู
<i>Diospyros maritima</i> Blume	ผลสด	(1),(5),(7), (14),(46),(47)	(3),(17),(40),(41), (37),(38),(39), (40),(41),(42), (43),(44),(45)	(48),(49), (50)	- ความเป็น พิษต่อปลา ขนาดเล็ก - ยับยั้งการ เจริญเติบโต ของเมล็ด ผักกาด	อิกะ โอกิฮารา และโยกิ
	ใบสด	(1),(5),(7), (14),(46),(47), (51),(52)	-	(48),(49), (50),(53)	เจอร์มิเคปโต	
	กิ่งก้าน	(1),(7),(14), (47),(48),(49)	-	(48), (49), (50)	- ด้านเชื้อรา	
<i>Diospyros Kaki</i> Thumb	ก้านใบ	-	-	(54)	-	กอนโด และคณะ
<i>Diospyros mafiensis</i>	เปลือกกราก	-	(13),(55)	-	-	คานและ เร็กกิกา
<i>Diospyros maritima</i> Blume	ลำต้น	(56),(57)	-	-	-	แสงและดู

ตาราง 1 (ต่อ)

ชื่อพืช	ส่วน	สารที่พบ			ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
		triterpenoids	naphthoquinones	กลุ่มอื่นๆ		
<i>Diospyros montana</i> (มะเกลือป่า)	ราก	-	(34)	(58)	ต้าน มาลาเรีย	ลิจิตินวิทยารุ และคณะ
<i>Diospyros maritima</i>	ลำต้น	(59),(60),(61), (62),(63),(64)	-	-	-	แขง และ กู
<i>Diospyros variegata</i> Kruz. (พญารากดำ)	ลำต้น	-	-	สารสกัด hexane	- ระงับปวด - ขับปัสสาวะ - ด้านการ อักเสบ	ครองสกุล และคณะ



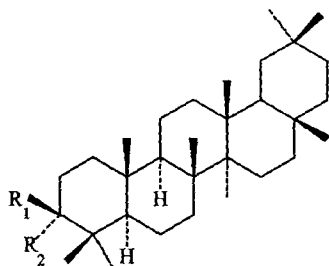
lupeol (1) $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$

betulin (7) $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

peregrinol(12) $R_1 = \beta\text{-H}$, $\alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$

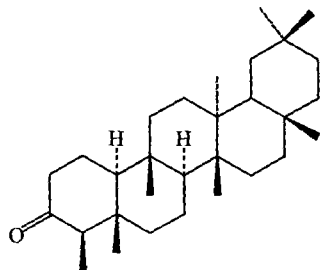
dioslupecin A (27) $R_1 = \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{C}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$, $R_2, R_3 = \text{CH}_3$

3-(*E*)-coumaroylbetulinnaldehyde (56) $R_1 = \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{C}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$, $R_2 = \text{CHO}$, $R_3 = \text{H}$

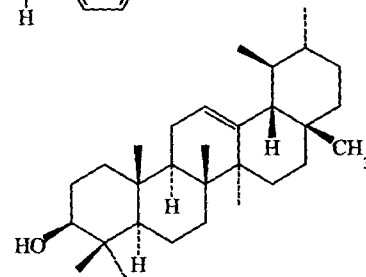


taraxerol (2) $R_1 = \beta\text{-H}$, $R_2 = \alpha\text{-H}$

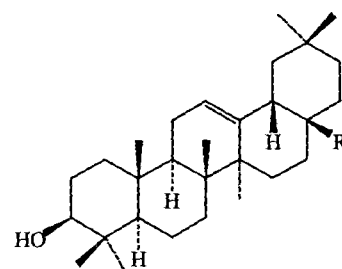
taraxeryl acetate (18) $R_1 = \beta\text{-OCOCH}_3$, $R_2 = \alpha\text{-H}$



friedelin (46)

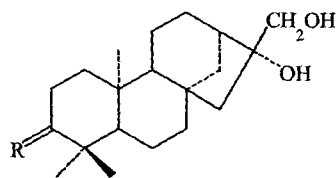


α -amyrin (16)



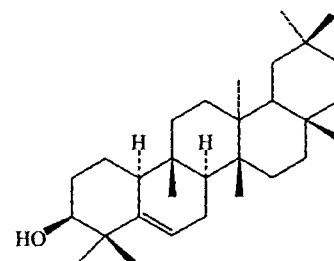
oleanolic acid (47) $R = \text{COOH}$

β -amyrin (51) $R = \text{CH}_3$



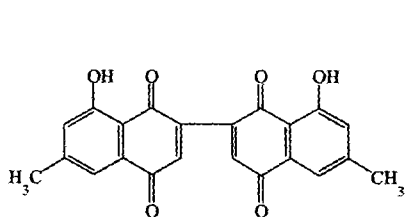
abbeokutone (48) $R = \text{O}$

3 α ,16 α ,17-trihydroxykaurane (49) $R = \text{H}$, $\alpha\text{-OH}$

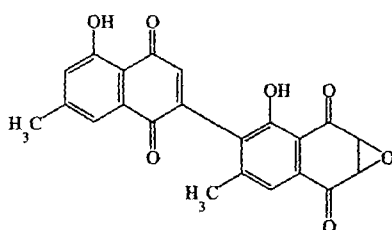


glutinol (52)

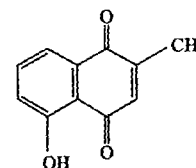
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสารในกลุ่ม triterpenoids จากพืชสกุล *Diospyros* spp.



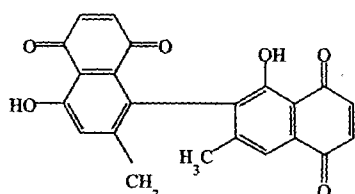
mamegakinone (6)



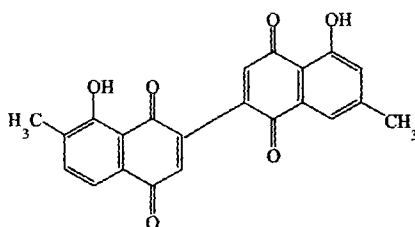
diosquinone (13)



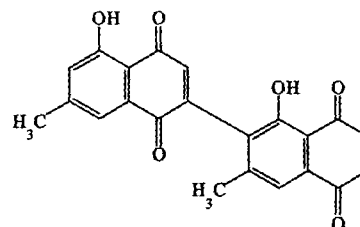
plumbagin (17)



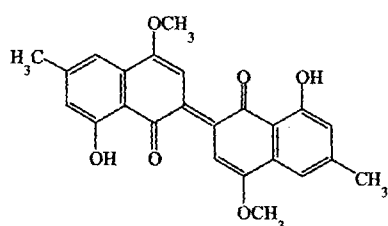
isodiospyrin (30)



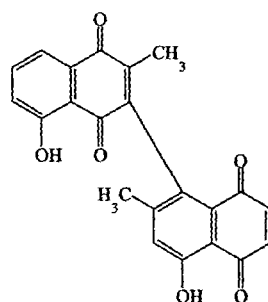
biramentaceone (32)



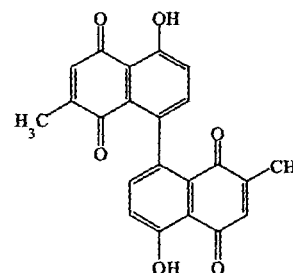
diospyrin (34)



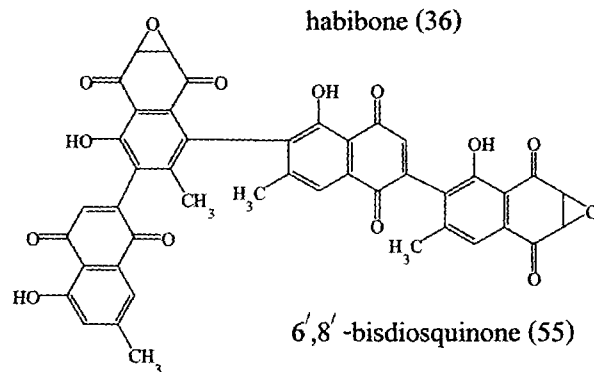
diosindigo A (35)



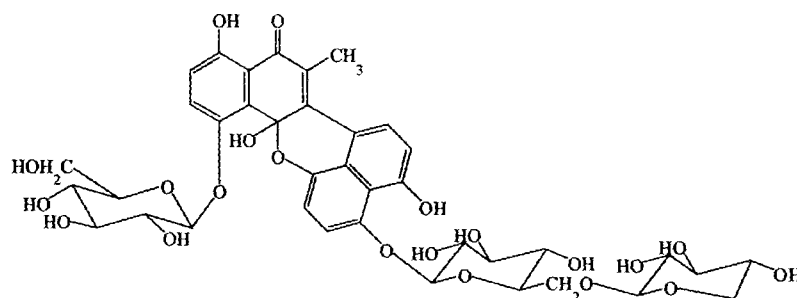
habibone (36)



maritnone (45)

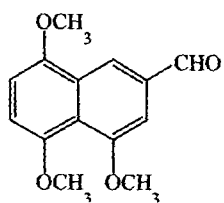


6',8'-bisdiosquinone (55)

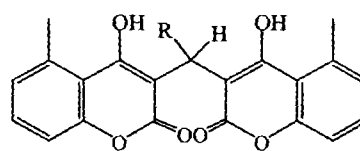


1',2'-binaphthalene-4-one-2',3-dimethyl-1,8'-epoxy-1,4',5,5',8,8'-hexahydroxy-8-O- β -glucopyranosyl-5'-O- β -xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (37)

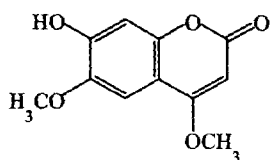
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของสารในกลุ่ม naphthoquinones จากพืชสกุล *Diospyros* spp.



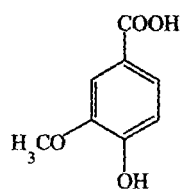
4,5,8-trimethoxy-2-naphthaldehyde (8)



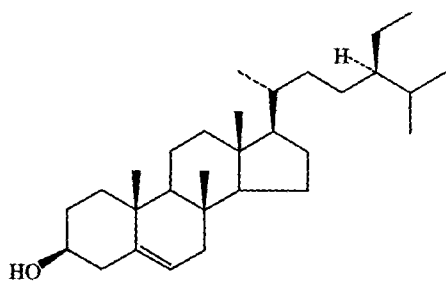
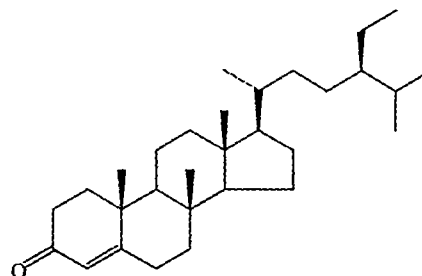
gerberinol (22) R = H

11-methylgerberinol (23) R = CH₃

scopoletin (50)



vanillic acid (53)

 β -sitosterol (10)

stigmast-4-en-3-one (19)

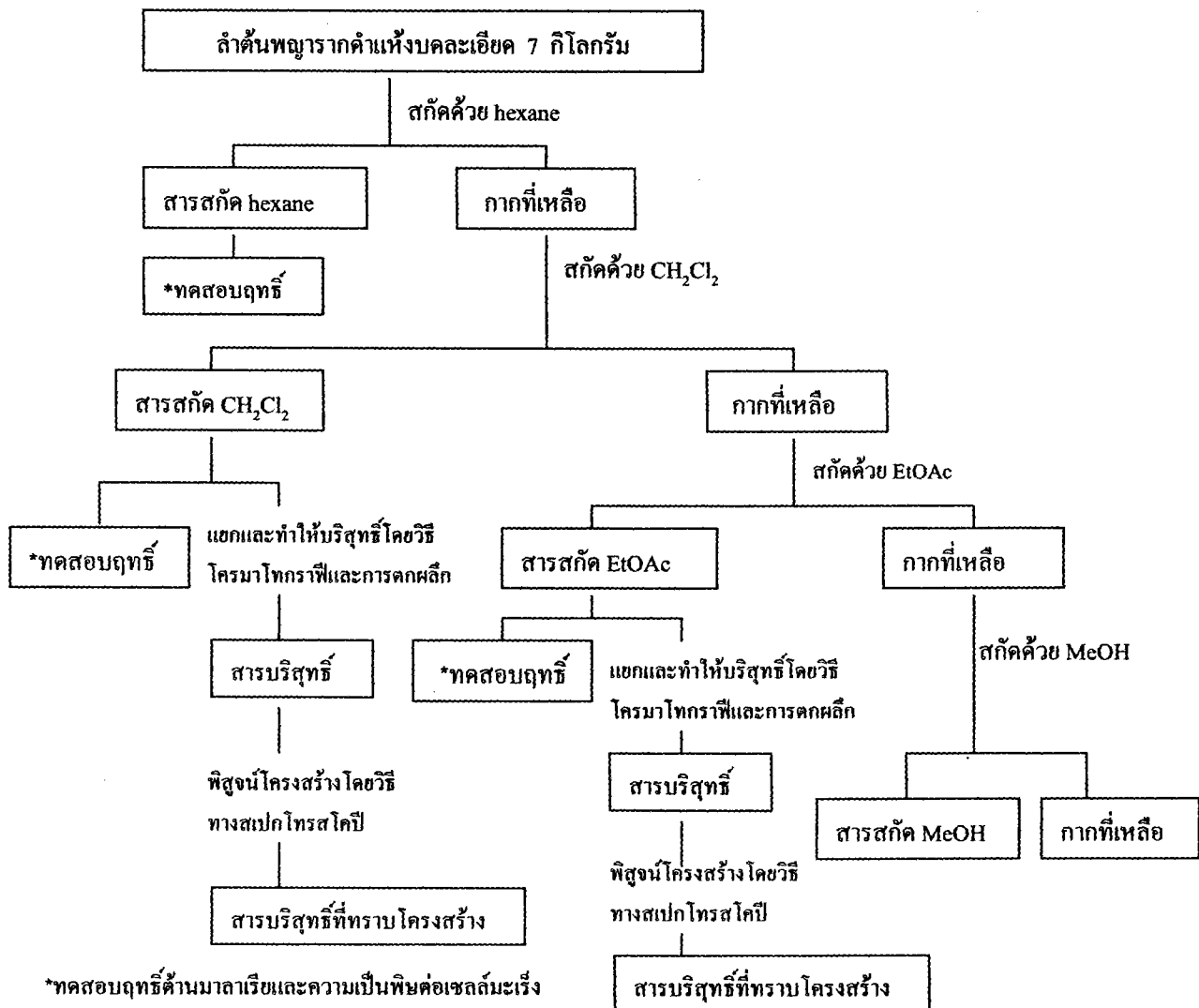
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของสารในกลุ่มอื่นๆจากพืชสกุล *Diospyros* spp.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. การสกัดสารจากลำต้นพญารากคำโดยใช้ตัวทำละลาย hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol และส่งสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ รายละเอียดแสดงในภาคผนวก
2. นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ สารสกัด dichloromethane และสารสกัด ethyl acetate มาแยกและทำให้บริสุทธิ์
3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และวิเคราะห์โครงสร้างของสารองค์ประกอบหลักที่แยกได้



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี

วัสดุและสารเคมี

1. ลำต้นพญารากคำแห้ง
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ (กลั่น)
3. silica gel สำหรับ column chromatography
silica gel (< 0.063 mm Merck 1.07729.5000)
silica gel ($0.063 - 0.200$ mm Merck 1.07734.2500)
4. silica gel สำหรับ thin – layer chromatography
silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck 7730.1000)
silica gel 60 GF₂₅₄ aluminium sheet (Merck 1.05554)
5. spray reagent (anisaldehyde : conc.H₂SO₄ : glacial acetic acid : methanol
ในอัตราส่วน 0.50 : 8.00 : 10.00 : 85.00 cm³)(Jork , et al. 1990 :196)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. คอลัมน์ ขนาด 10 7 5 3 2 1 cm
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. หลอดอัลตราไวโอเลต (Spectroline ENF – 260 C/F)
4. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
5. เครื่องบดสมุนไพร
6. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT-IR Spectrum BX)
7. Glass drying oven (Buchi B-580)
8. Mass Spectrometer (Finnigan MAT 90)
9. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)
10. UV-VIS Spectrophotometer (Shimadzu UV-2401PC)
11. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (Bruker Avance 300)

การสกัดสารจากลำต้นพญารากคำแห้ง การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์

1. วิธีการสกัดสาร

ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยแช่ลำต้นพญารากคำแห้งบดละเอียด 7 กิโลกรัมใน hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ

1.1 การสกัดสารด้วย hexane

แช่ลำต้นพญารากคำแห้งบดละเอียด 7 กิโลกรัม ใน hexane 10 ลิตร 7 วัน กรองสารละลาย ที่ได้แล้วทำให้เข้มข้นโดยระเหย hexane ออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิห้อง ได้สารสกัด hexane กากที่เหลือนำมาแช่ใน hexane ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารสกัด hexane ทั้งหมดเข้าด้วยกัน ชั่งน้ำหนักสารสกัด hexane ได้ทั้งหมด 22 กรัม

1.2 การสกัดสารด้วย dichloromethane

กากที่เหลือจากการสกัดด้วย hexane นำมาแช่ใน dichloromethane ดำเนินการเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ชั่งน้ำหนักสารสกัด dichloromethane ได้ทั้งหมด 17 กรัม

1.3 การสกัดสารด้วย ethyl acetate

กากที่เหลือจากการสกัดด้วย dichloromethane นำมาแช่ใน ethyl acetate ดำเนินการเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ชั่งน้ำหนักสารสกัด ethyl acetate ได้ทั้งหมด 16 กรัม

1.4 การสกัดสารด้วย methanol

กากที่เหลือจากการสกัดด้วย ethyl acetate นำมาแช่ใน methanol ดำเนินการเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ชั่งน้ำหนักสารสกัด methanol ได้ทั้งหมด 95 กรัม

1.5 นำสารสกัดที่ได้ส่งทดสอบฤทธิ์ด้านมาลาเรียและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

2. วิธีการแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์

การวิจัยนี้จะศึกษาการแยกสารสกัด CH_2Cl_2 และสารสกัด EtOAc

2.1 การแยกสารสกัด dichloromethane และทำสารให้บริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 6)

นำสารสกัด dichloromethane 17 กรัม มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography ขนาด 10 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 850 กรัม แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane dichloromethane ethyl acetate โดยเพิ่มสภาพขั้วครั้งละ 5 % จนถึง 100 % เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่เก็บได้รวมเป็นกลุ่มๆ ตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) การหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ทราบได้จากการมองเห็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV ; 254 และ/หรือ 365 nm) หรือใช้ spray reagent บนแผ่น TLC นำไปให้ความร้อนที่ 80 – 120 °C นาน 1 – 2 นาที จะปรากฏสีที่แตกต่างกัน รวมส่วนที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน แต่ละกลุ่ม ที่รวมได้

นำไปประเหต้วทำละลายให้แห้ง กลุ่มสารต่างๆที่ได้นำไปแยกและทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (CC) และ/หรือ preparative TLC และ/หรือการตกผลึก กลุ่มสารทั้งหมดที่แยกได้มี 5 กลุ่มใหญ่

2.1.1 กลุ่ม C1 เป็นของแข็งสีม่วง (0.60 กรัม) จะออกมาด้วย hexane

2.1.2 กลุ่ม C2 เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (1.0 กรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (70 : 30) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 40 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 20 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่มย่อย

กลุ่ม C2.1 เป็นของแข็งปนของเหลวหนืดสีเหลือง (154.5 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (80 : 20)

กลุ่ม C2.2 เป็นของเหลวหนืดสีแดง (12.2 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (85 : 15) ได้สารประกอบ 2 หน้า 12.2 มิลลิกรัม

กลุ่ม C2.3 เป็นของแข็งสีขาวปนม่วง (52.5 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (10 : 90) ล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 25.8 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1

กลุ่ม C2.4 เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง (329.4 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (10 : 90) ล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 10.9 มิลลิกรัม

2.1.3 กลุ่ม C3 เป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (1.5 กรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (20 : 80) ล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 800.6 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1

2.1.4 กลุ่ม C4 เป็นของแข็งสีเหลือง (5.3 กรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (90 : 10) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 5 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 220 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 50 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มย่อย

กลุ่ม C4.1 เป็นของแข็งสีขาวปนเขียว (100.9 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (70 : 30) ล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 74.3 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1

กลุ่ม C4.2 เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง (200 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (10 : 90) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 1 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 8 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 3 กลุ่มย่อย

กลุ่ม C4.2.1 เป็นของแข็งสีขาวปนเขียว (49.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (30 : 70) ล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 40.2 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ I

กลุ่ม C4.2.2 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (11.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (20 : 80)

กลุ่ม C4.2.3 เป็นของแข็งสีเหลือง (10.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2

กลุ่ม C4.3 เป็นของแข็งสีเหลือง (2.5 กรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (10 : 90) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 100 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มหัวตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 20 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มย่อย

กลุ่ม C4.3.1 เป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาลแดง (7.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (35 : 65) ถ้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 3.3 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ I

กลุ่ม C4.3.2 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (100.2 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (20 : 80) ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 57.2 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ II

กลุ่ม C4.3.3 เป็นของแข็งสีเขียว (140.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 6 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มหัวตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 2 กลุ่มย่อย

กลุ่ม C4.3.3.1 เป็นของแข็งสีเขียว (34.4 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2

กลุ่ม C4.3.3.2 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (50.6 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (95 : 5) ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 39.1 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 3

กลุ่ม C4.3.4 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (769.9 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (94 : 6) แบ่งมา 500 มิลลิกรัม นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 35 กรัม จะด้วย ตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มหัวตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 20 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 2 กลุ่มย่อย

กลุ่ม C4.3.4.1 เป็นของแข็งสีขาว (33.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (70 : 30)

กลุ่ม C4.3.4.2 เป็นของแข็งสีขาว (60.5 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (90 : 10)

กลุ่ม C4.3.5 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (629.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (91 : 9)

กลุ่ม C4.4 เป็นของแข็งสีเหลือง (200 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (40 : 60)

กลุ่ม C4.5 เป็นของแข็งสีเหลือง (300 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย EtOAc

2.1.5 กลุ่ม C5 เป็นของแข็งสีดำ (3.6 กรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (70 : 30)

2.2 การแยกสารสกัด ethyl acetate และทำสารให้บริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 7)

นำสารสกัด ethyl acetate 16 กรัม มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทำนองเดียวกับสารสกัด CH_2Cl_2 พบว่าแยกสารได้ 7 กลุ่มใหญ่

2.2.1 กลุ่ม E1 เป็นของเหลวหนืดสีเขียวย่อน (0.4 กรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (50 : 50) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 8 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 20 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มย่อย

กลุ่ม E1.1 เป็นของแข็งปนของเหลวหนืดสีขาว (10.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (90 : 10)

กลุ่ม E1.2 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (81.7 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (80 : 20) ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 50.9 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 4

กลุ่ม E1.3 เป็นของเหลวหนืดสีเขียวย่อน (3.5 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (75 : 25)

กลุ่ม E1.4 เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง (4.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (70 : 30)

กลุ่ม E1.5 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง (117.6 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2

2.2.2 กลุ่ม E2 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองอ่อน (110.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (40 : 60) ถ้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 60.4 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1

2.2.3 กลุ่ม E3 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (1.4 กรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (40 : 60) ถ้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 73.5 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1

2.2.4 กลุ่ม E4 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (1.1 กรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (95 : 5) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 35 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง methanol เก็บส่วนละ 50 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่มย่อย

กลุ่ม E4.1 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (7.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane :

CH_2Cl_2 (50 : 50)

กลุ่ม E4.2 เป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (15.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 7.0 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ I

กลุ่ม E4.3 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (169.7 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (95 : 5) ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 81.4 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 5

กลุ่ม E4.4 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (360.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย EtOAc : MeOH (50 : 50) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 15 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่มย่อย

กลุ่ม E4.4.1 เป็น ของแข็งสีขาวปนเขียว (51.6 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (40 : 60) ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 14.6 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ II

กลุ่ม E4.4.2 เป็นของเหลวหนืดสีเขียวอ่อน (32.5 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (25 : 75)

กลุ่ม E4.4.3 เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (128.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2

กลุ่ม E4.4.4 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (60.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (80 : 20)

2.2.5 กลุ่ม E5 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (430.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (90 : 10) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 18 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 50 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่มย่อย

กลุ่ม E5.1 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (2.1 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (50 : 50) ถ้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 0.8 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ II

กลุ่ม E5.2 เป็นของเหลวหนืดสีส้ม (80.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (97 : 3) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 1 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 32 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : EtOAc โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 3 กลุ่มย่อย

กลุ่ม E5.2.1 เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน (9.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : EtOAc (80 : 20)

กลุ่ม E5.2.2 เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (41.4 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : EtOAc (60: 40)

กลุ่ม E5.2.3 เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (2.0 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย EtOAc

กลุ่ม E5.3 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (64.2 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (95 : 5)

กลุ่ม E5.4 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (78.7 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (80 : 20)

2.2.6 กลุ่ม E6 เป็นของแข็งสีน้ำตาล (1.5 กรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (85 :15) นำมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm โดยใช้ silica gel (0.063 – 0.200 mm) 55 กรัม จะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มหัวตัวทำละลายไปจนถึง methanol เก็บส่วนละ 50 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มย่อย

กลุ่ม E6.1 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (96.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane : CH_2Cl_2 (70 : 30)

กลุ่ม E6.2 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (28.8 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (90 : 10) ล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 9.1 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ II

กลุ่ม E6.3 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (101.9 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (95 : 5) ล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 22.6 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 3

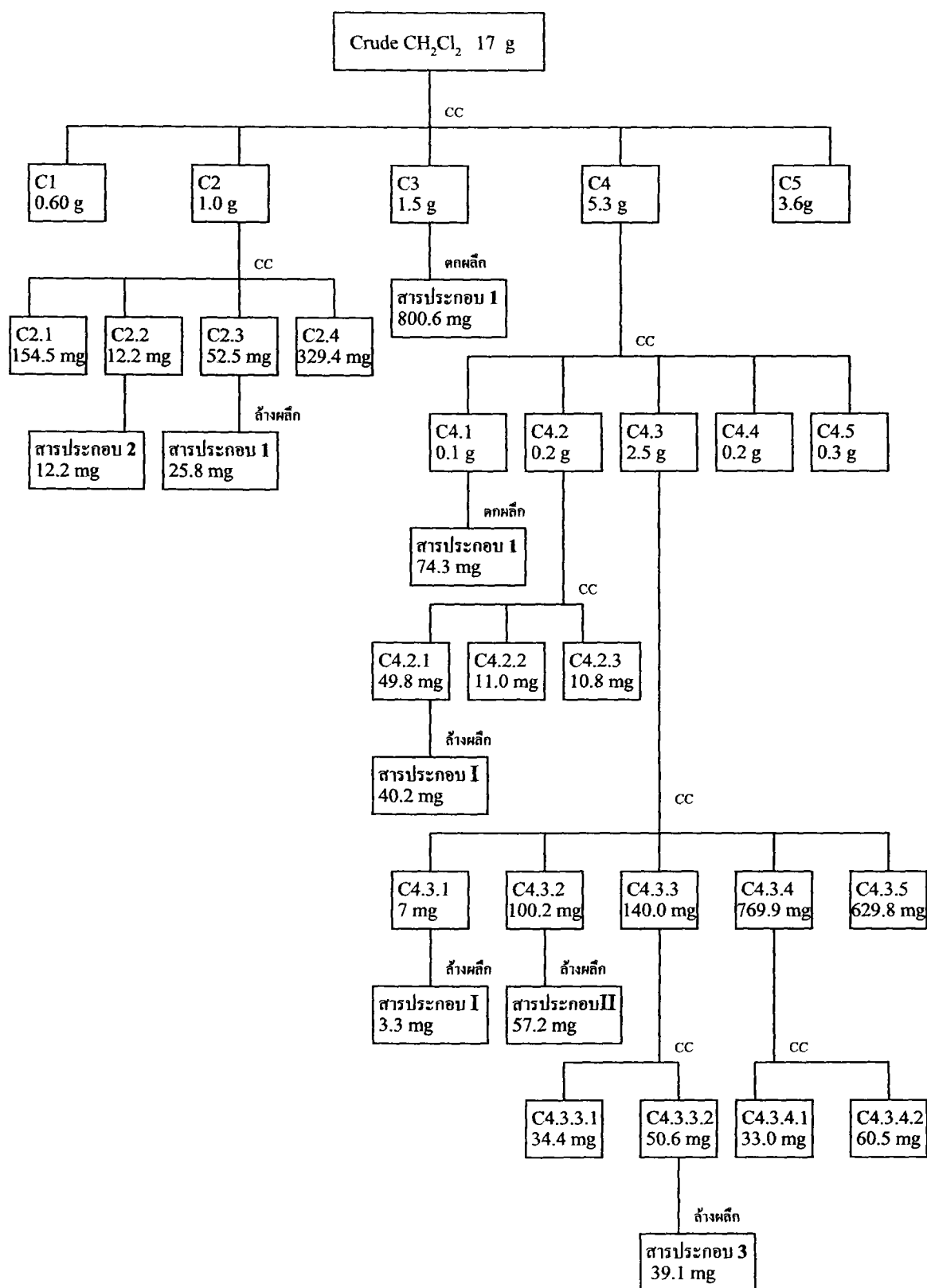
กลุ่ม E6.4 เป็นของแข็งสีน้ำตาล (33.4 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (40 : 60)

กลุ่ม E6.5 เป็นของแข็งสีน้ำตาล (414.7 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย EtOAc : MeOH (90 : 10)

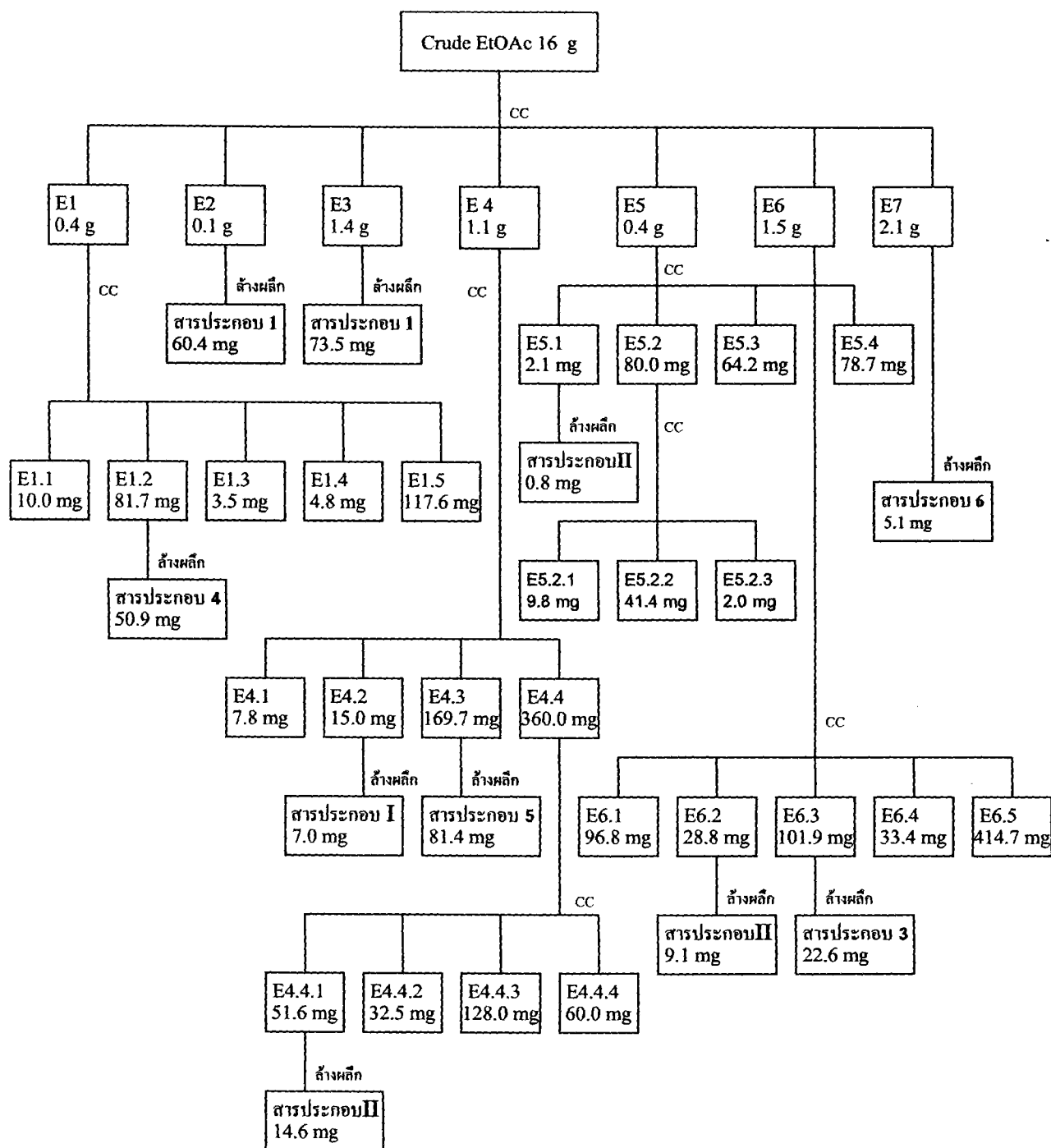
2.2.7 กลุ่ม E7 เป็นของแข็งสีน้ำตาล (2.13 กรัม) จะออกมาด้วย CH_2Cl_2 : EtOAc (50 : 50) ล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว แล้วตกผลึกด้วย methanol หนัก 5.1 มิลลิกรัม ได้สารประกอบ 6

3. การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาจุดหลอมเหลวและศึกษาโครงสร้างโดยวิเคราะห์ข้อมูล ที่ได้จากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ Ultraviolet spectroscopy (UV) Infrared spectroscopy (IR) Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) และ Mass spectrometry (MS)



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิการแยกสารสกัดชั้น CH_2Cl_2



ภาพประกอบ 7 แผนภูมิการแยกสารสกัดชั้น EtOAc

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากลำต้นพญารากคำ

สกัดลำต้นพญารากคำแห้งบดละเอียด 7 กิโลกรัม ด้วย hexane 3 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน กรองแล้วระเหย hexane ออกจนแห้ง ได้สารสกัด hexane 22 กรัม กากที่ผ่านการสกัดด้วย hexane นำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 EtOAc และ MeOH ตามลำดับ โดยทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัดด้วย hexane ได้สารสกัด CH_2Cl_2 เป็นของแข็งสีน้ำตาลหนัก 17 กรัม สารสกัด EtOAc เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลหนัก 16 กรัม และสารสกัด MeOH 95 กรัม

2. ผลการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2 และการทำให้บริสุทธิ์

2.1.1 นำสารสกัด CH_2Cl_2 17 กรัม มาแยกด้วย column chromatography แล้วจะด้วยตัวทำละลาย hexane เพิ่มขั้วด้วย CH_2Cl_2 ครั้งละ 10% จนถึง 100% จากนั้นเพิ่มขั้วโดย EtOAc ครั้งละ 10% จนถึง 100% เก็บส่วนที่ชะครั้งละ 100 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังตาราง 2

ตาราง 2 ผลการแยกสารสกัด CH_2Cl_2 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(กรัม)	ลักษณะสาร
Hexane	C1	0.6	ของแข็งสีม่วง
Hexane : CH_2Cl_2 (70:30)	C2	1.0	ของเหลวหนืดสีเหลือง
Hexane : CH_2Cl_2 (20:80)	C3	1.5	ของแข็งสีขาวปนน้ำตาล
CH_2Cl_2 : EtOAc (90:10)	C4	5.3	ของแข็งสีเหลือง
CH_2Cl_2 : EtOAc (70:30)	C5	3.6	ของแข็งสีดำ

2.1.2 นำสารกลุ่ม C2 มาแยกต่อด้วย column chromatography แล้วจะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะ

ได้ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่ม ดังตาราง 3

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม C2

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (80:20)	C2.1	154.5	ของแข็งปนของเหลวหนืดสีเหลือง
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (75:25)	C2.2	12.2	ของเหลวหนืดสีแดง
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (10:90)	C2.3	52.5	ของแข็งสีขาวปนม่วง
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (10:90)	C2.4	329.4	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

2.1.3 สารกลุ่ม C2.1 ไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

สารกลุ่ม C2.2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดง เป็นสารประกอบ 2 หมู่ 12.2 มิลลิกรัม ได้นำไปศึกษาสูตรโครงสร้าง

สารกลุ่ม C2.3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนม่วง นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาว ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ 1 หมู่ 52.5 มิลลิกรัม

สารกลุ่ม C2.4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาว หมู่ 25.8 มิลลิกรัม

2.1.4 สารกลุ่ม C3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 800.6 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1 ได้นำไปศึกษาสูตรโครงสร้าง

2.1.5 นำสารกลุ่ม C4 มาแยกต่อด้วย column chromatography แล้วยะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH₂Cl₂ โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มดังตาราง 4

ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม C4

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(g)	ลักษณะสาร
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (70:30)	C4.1	0.1	ของแข็งสีขาวปนเขียว
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (10:90)	C4.2	0.2	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (10:90)	C4.3	2.5	ของแข็งสีเหลือง
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (40:60)	C4.4	0.2	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
EtOAc	C4.5	0.3	ของแข็งสีขาวปนเหลือง

2.1.6 สารกลุ่ม C4.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเขียว นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาว ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ 1 น้ำหนัก 74.3 มิลลิกรัม

นำสารกลุ่ม C4.2 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH₂Cl₂ โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังตาราง 5

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.2

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (30:70)	C4.2.1	49.8	ของแข็งสีขาวปนเขียว
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (20:80)	C4.2.2	11.0	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH ₂ Cl ₂	C4.2.3	10.8	ของแข็งสีขาวปนเหลือง

2.1.7 สารกลุ่ม C4.2.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเขียว นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ I น้ำหนัก 40.2 มิลลิกรัม

สารกลุ่ม C4.2.2 และ C4.2.3 ไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

นำสารกลุ่ม C4.3 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.3

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH_2Cl_2 (35:65)	C4.3.1	7.0	ของแข็งสีขาวปนน้ำตาลแดง
Hexane : CH_2Cl_2 (20:80)	C4.3.2	100.2	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH_2Cl_2	C4.3.3	140.0	ของแข็งสีเขียว
CH_2Cl_2 : EtOAc (94:06)	C4.3.4	769.9	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH_2Cl_2 : EtOAc (91:09)	C4.3.5	629.8	ของแข็งสีขาวปนเหลือง

2.1.8 สารกลุ่ม C4.3.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาลแดง นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาวหนัก 7 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 1

สารกลุ่ม C4.3.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ II หนัก 57.2 มิลลิกรัม

นำสารกลุ่ม C4.3.3 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ได้สารทั้งหมด 2 กลุ่ม ดังตาราง 7

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.3.3

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
CH_2Cl_2	C4.3.3.1	34.4	ของแข็งสีเขียว
CH_2Cl_2 : EtOAc (95:5)	C4.3.3.2	50.6	ของแข็งสีขาวปนเหลือง

2.1.9 สารกลุ่ม C4.3.3.1 ไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

สารกลุ่ม C4.3.3.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบ 3 หน้า 39.1 มิลลิกรัม ได้นำไปศึกษาสูตรโครงสร้าง

2.1.10 นำสารกลุ่ม C4.3.4 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วย ตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะ ได้ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ได้สารทั้งหมด 2 กลุ่ม ดังตาราง 8

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม C4.3.4

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH_2Cl_2 (70:30)	C4.3.4.1	33.0	ของแข็งสีขาว
CH_2Cl_2 : EtOAc (90:10)	C4.3.4.2	60.5	ของแข็งสีขาว

2.1.11 สารกลุ่ม C4.3.4.1 และ สารกลุ่ม C4.3.4.2 ไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

สารกลุ่ม C4.3.5 C4.4 C4.5 และ C5 ไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

2.2 ผลการแยกสารสกัด EtOAc และการทำให้บริสุทธิ์

2.2.1 นำสารสกัด EtOAc 16 กรัม มาแยกด้วย column chromatography (silica gel 0.063 – 0.200 mm) 800 กรัม แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane เพิ่มขั้วด้วย CH_2Cl_2 ครั้งละ 10% จนถึง 100% จากนั้นเพิ่มขั้วโดย EtOAc ครั้งละ 10% จนถึง 100% เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 7 กลุ่ม ดังตาราง 9

ตาราง 9 ผลการแยกสารสกัดชั้น EtOAc โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(กรัม)	ลักษณะสาร
Hexane : CH_2Cl_2 (50:50)	E1	0.4	ของเหลวหนืดสีเขียวอ่อน
Hexane : CH_2Cl_2 (40:60)	E2	0.1	ของแข็งสีขาวปนเหลืองอ่อน
Hexane : CH_2Cl_2 (40:60)	E3	1.4	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH_2Cl_2 : EtOAc (95:05)	E4	1.1	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

ตาราง 9 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(กรัม)	ลักษณะสาร
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (90:10)	E5	0.4	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (85:15)	E6	1.5	ของแข็งสีน้ำตาล
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (50:50)	E7	2.1	ของแข็งสีน้ำตาล

2.2.2 นำสารกลุ่ม E1 มาแยกด้วย column chromatography แล้วจะได้ตัวทำละลาย hexane hexane : CH₂Cl₂ โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่จะได้ครั้งละ 50 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังตาราง 10

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม E1

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (90:10)	E1.1	10.0	ของแข็งปนของเหลวหนืดสีขาว
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (80:20)	E1.2	81.7	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (75:25)	E1.3	3.5	ของเหลวหนืดสีเขียว
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (70:30)	E1.4	4.8	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
CH ₂ Cl ₂	E1.5	117.6	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง

2.2.3 สารกลุ่ม E1.1 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

สารกลุ่ม E1.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวหนัก 50.9 มิลลิกรัม เป็นสารประกอบ 4 ได้นำไปศึกษาสูตรโครงสร้าง

สารกลุ่ม E1.3 E1.4 และ E1.5 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

2.2.4 สารกลุ่ม E2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองอ่อน นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาว จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็น สารประกอบ 1 หนัก 60.4 มิลลิกรัม

2.2.5 สารกลุ่ม E3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย hexane ได้ของแข็งสีขาว จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ 1 หนัก 73.5 มิลลิกรัม

2.2.6 นำสารกลุ่ม E4 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 4 กลุ่ม ดังตาราง 11

ตาราง 11 ผลการแยกสารกลุ่ม E4

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH_2Cl_2 (50:50)	E4.1	7.8	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH_2Cl_2	E4.2	15.0	ของแข็งสีขาวปนน้ำตาล
CH_2Cl_2 : EtOAc (95:05)	E4.3	169.7	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
EtOAc : MeOH (50:50)	E4.4	360.0	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

2.2.7 สารกลุ่ม E4.1 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

สารกลุ่ม E4.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ I หนัก 7.0 มิลลิกรัม

สารกลุ่ม E4.3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบ 5 หนัก 81.4 มิลลิกรัม นำไปศึกษาสูตร โครงสร้าง

นำสารกลุ่ม E4.4 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 4 กลุ่ม ดังตาราง 12

ตาราง 12 ผลการแยกสารกลุ่ม E4.4

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (40:60)	E4.4.1	51.6	ของแข็งสีขาวปนเขียว
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (25:75)	E4.4.2	32.5	ของเหลวหนืดสีเขียวอ่อน
CH ₂ Cl ₂	E4.4.3	128.0	ของเหลวหนืดสีเหลือง
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (80:20)	E4.4.4	60.0	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

2.2.8 สารกลุ่ม E4.4.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเขียว นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ II หนัก 14.6 มิลลิกรัม

สารกลุ่ม E4.4.2 E4.4.3 และ E4.4.4 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

2.2.9 นำสารกลุ่ม E5 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH₂Cl₂ โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วน ที่ชะได้ ครั้งละ 50 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 4 กลุ่ม ดังตาราง 13

ตาราง 13 ผลการแยกสารกลุ่ม E5

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH ₂ Cl ₂ (50:50)	E5.1	2.1	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (97:03)	E5.2	80.0	ของเหลวหนืดสีส้ม
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (95:05)	E5.3	64.2	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (80:20)	E5.4	78.7	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

2.2.10 สารกลุ่ม E5.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ II หนัก 0.8 มิลลิกรัม

นำสารกลุ่ม E5.2 มาแยกด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : EtOAc โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง EtOAc เก็บส่วนที่ชะได้

ครั้งละ 10 มิลลิกรัม ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังตาราง 14

สารกลุ่ม E5.3 และ E5.4 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

ตาราง 14 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.2

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : EtOAc (80:20)	E5.2.1	9.8	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
Hexane : EtOAc (60:40)	E5.2.2	41.4	ของเหลวหนืดสีเหลือง
EtOAc	E5.2.3	2.0	ของเหลวหนืดสีเหลือง

2.2.11 สารกลุ่ม E5.2.1 E5.2.2 และ E5.2.3 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

2.2.12 นำสารกลุ่ม E6 มาแยกต่อด้วย column chromatography แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : CH_2Cl_2 โดยค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายไปจนถึง methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 มิลลิกรัม ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สารทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังตาราง 15

ตาราง 15 ผลการแยกสารกลุ่ม E6

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสาร
Hexane : CH_2Cl_2 (70:30)	E6.1	96.8	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
Hexane : CH_2Cl_2 (90:10)	E6.2	28.8	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH_2Cl_2 : EtOAc (95:05)	E6.3	101.9	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
CH_2Cl_2 : EtOAc (40:60)	E6.4	33.4	ของแข็งสีน้ำตาล
EtOAc : MeOH (90:10)	E6.5	414.7	ของแข็งสีน้ำตาล

2.2.13 สารกลุ่ม E6.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล $^1\text{H NMR}$ พบว่าเป็นสารประกอบ II หนัก 9.1 มิลลิกรัม

สารกลุ่ม E6.3 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองนำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และจากข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารประกอบ 3 หน่วย 22.6 มิลลิกรัม

สารกลุ่ม E6.4 และ E6.5 ไม่ได้นำไปศึกษาต่อ

2.2.14 สารกลุ่ม E7 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวตาล แบ่งมา 30 มิลลิกรัม นำมาล้างด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบ 6 ได้นำไปศึกษาสูตรโครงสร้าง

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (แสดงในภาคผนวก)

3.1 ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

3.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.3 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

4. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ นำมาศึกษาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

1. สารประกอบ 1 เป็นผลึกสีขาวหนัก 800.6 mg มี จุดหลอมเหลว 220-222 °C

FTIR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3345 2944 2862 1638 1453 1380 1043

^1H NMR (300 MHz CDCl_3) δ : 4.65 (1H, *br s*) 4.55 (1H, *br s*) 3.16 (1H, *dd*, $J = 10.8, 5.1$ Hz) 2.35 (1H, *dt*, $J = 10.9, 5.5$ Hz) 1.82-1.96 (m) 1.65 (3H, *s*) 1.00 (3H, *s*) 0.94 (3H, *s*) 0.92 (3H, *s*) 0.80 (3H, *s*) 0.76 (3H, *s*) 0.73 (3H, *s*) 0.66 (1H, *d*, $J = 9.1$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz CDCl_3) δ : 150.9 109.3 79.0 55.3 50.4 48.3 48.0 43.0 42.8 40.8 40.0 38.8 38.7 38.0 37.1 35.6 34.3 29.7 28.0 27.4 25.1 20.9 19.3 18.3 18.0 16.1 15.9 15.3 14.5

EI-MS m/z (% relative intensity) : 426 $[\text{M}]^+$ (34) 411(30) 218(23) 189(34) 91(100) 77(65)

2. สารประกอบ 2 เป็นของเหลวหนืดสีแดงหนัก 12.2 มิลลิกรัม

FTIR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 2927 2860 1708 1459 1382

^1H NMR (300 MHz CDCl_3) δ : 4.66 (1H, *br s*) 4.55 (1H, *br s*) 2.24-2.52 (m) 1.84-1.97 (m) 1.66 (3H, s) 1.22 (3H, s) 1.04 (3H, s) 1.00 (3H, s) 0.93 (3H, s) 0.90 (3H, s) 0.77 (3H, s)

^{13}C NMR (75 MHz CDCl_3) δ : 218.2 150.8 109.3 54.9 49.7 48.2 47.9 47.3 42.9 42.8 40.7 39.9 39.6 36.8 35.5 34.1 33.5 29.6 27.4 26.6 25.1 21.4 21.0 19.6 19.2 17.9 15.9 15.7 14.4

EI-MS m/z (% relative intensity) : 424 $[\text{M}]^+$ (10) 218(7) 189(13) 91(100) 77(66)

3. สารประกอบ 3 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 39.1 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 237-240 $^{\circ}\text{C}$

FTIR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3396 2941 2862 1643 1454 1375 1027

^1H NMR (300 MHz CDCl_3) δ : 4.65 (1H, *br s*) 4.55 (1H, *br s*) 3.77 (1H, d, $J = 10.7$ Hz) 3.30 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) 3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 4.9$ Hz) 2.35 (1H, dt, $J = 10.5, 6.2$ Hz) 1.65 (3H, s) 0.99 (3H, s) 0.95 (3H, s) 0.94 (3H, s) 0.79 (3H, s) 0.73 (3H, s) 0.65 (1H, d, $J = 9.4$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz CDCl_3) δ : 150.4 109.6 78.9 60.5 55.2 50.3 48.7 47.7 42.7 40.9 39.3 38.6 37.3 37.1 34.2 33.9 29.7 29.1 27.9 27.3 27.0 25.2 20.8 19.0 18.2 16.0 15.9 15.3 14.7

EI-MS m/z (% relative intensity) : 442 $[\text{M}]^+$ (18) 411(63) 203(48) 189(21) 91(79) 77(100)

4. สารประกอบ 4 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 50.9 mg จุดหลอมเหลว 190-192 $^{\circ}\text{C}$

FTIR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 2942 2866 1735 1451 1379 1243 1027

^1H NMR (300 MHz CDCl_3) δ : 4.66 (1H, *br s*) 4.54 (1H, *br s*) 4.44 (1H, dd, $J = 10.8, 5.8$ Hz) 0.76 (d, $J = 10.8, 5.8$ Hz) 2.33 (1H, dt, $J = 11.1, 5.6$ Hz) 2.28-2.40 (m) 1.66 (3H, s) 1.00 (3H, s) 0.91 (3H, s) 0.82 (9H, s) 0.81 (3H, s) 2.01 (3H, s)

^{13}C NMR (75 MHz CDCl_3) δ : 171.0 150.9 109.3 80.9 55.3 50.3 48.2 48.0 42.9 42.8 40.8 39.9 38.3 38.0 37.7 37.0 35.5 34.2 29.8 28.2 27.4 25.0 23.7 20.9 21.3 19.0 18.1 17.9 16.4 16.1 15.9 14.5

EI-MS m/z (% relative intensity) : 468 $[\text{M}]^+$ (28) 396(100) 218(24) 189(22) 91(49)

5. สารประกอบ 5 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 81.4 mg จุดหลอมเหลว 209-210 °C

FTIR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹ : 3587 2942 2868 1739 1458 1388 1239 1033

¹H NMR (300 MHz CDCl₃) δ : 4.66 (1H, *br s*) และ 4.56 (1H, *br s*) 4.22 (1H, d, *J* = 11.0 Hz) 3.83 (1H, d, *J* = 11.0 Hz) 3.16 (1H, dd, *J* = 10.3, 4.8 Hz) Hz) 2.42 (1H, dt, *J* = 10.8, 5.8 Hz) 1.65 (3H, s) 0.80 (3H, s) 0.94 (3H, s) 0.95 (3H, s) 0.73 (3H, s) 1.00 (3H, s) 2.04 (3H, s) 0.65 (1H, d, *J* = 9.0)

¹³C NMR (75 MHz CDCl₃) δ : 171.6 150.1 109.8 78.9 62.8 55.2 50.3 48.7 47.6 46.3 42.6 40.8 38.8 38.7 37.5 34.5 34.1 29.7 29.5 27.9 27.3 27.0 25.1 21.0 20.7 19.1 18.2 16.0 15.3 14.7

EI-MS *m/z* (% relative intensity) : 484 [M]⁺ (36) 466(84) 411(63) 216(52) 189(84) 91(100)

6. สารประกอบ 6 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 5.1 mg จุดหลอมเหลว 285-287 °C

FTIR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹ : 3385 2938 1458 1436 1030

¹H NMR (300 MHz CDCl₃) δ : 0.61-0.94 (m) 1.18-2.30 (m) 4.34 (d, 7.5 Hz) 3.22-3.76 5.29 (*br, s*)

¹³C NMR (75 MHz CDCl₃) δ : 11.7 11.8 18.7 18.9 19.2 19.7 20.9 22.9 24.2 25.9 28.1 29.0 29.5 31.8 33.8 36.0 36.5 37.1 39.6 42.2 45.7 49.9 55.9 56.6 61.9 70.0 76.2 73.4 75.5 101.0 122.2 140.1

7. สารประกอบ I เป็นของผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol

8. สารประกอบ II เป็นสารประกอบ long chain hydrocarbon

บทที่ 5

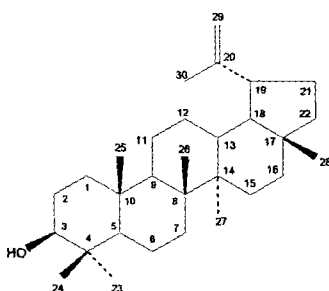
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาจุดหลอมเหลวและศึกษาโครงสร้างโดยวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค IR NMR และ MS

การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารประกอบ 1



สารประกอบ 1 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 800.6 mg จุดหลอมเหลว 220-222 °C

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $\nu_{\max}$ (CHCl_3) 3345 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ O-H ส่วน 2944, 2862 cm^{-1} เป็นแถบการยืด C-H และ 1638 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C=C ของ terminal methylene แถบการงอ C-H ของ CH_3 พบที่ 1453, 1380 ส่วน 1043 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C-O

^1H NMR spectrum แสดงสัญญาณของ vinylic proton ตำแหน่งที่ 29 คือ ที่ δ 4.65 (1H, *br s*) และ 4.55 (1H, *br s*) ส่วนสัญญาณที่ δ 3.16 (1H, *dd*, $J = 10.8, 5.1$ Hz) เป็นของ axial proton ตำแหน่ง 3 และ methyl proton ทั้ง 7 หมู่ แสดงสัญญาณ singlet ที่ δ 1.65 (H-30) 1.00 (H-26) 0.94 (H-23) 0.92 (H-27) 0.80 (H-25) 0.76 (H-28) และ 0.73 (H-24)

จาก ^1H - ^1H COSY spectrum มีการ coupling ระหว่าง H-21 กับ H-19 (δ 1.82-1.96 และ δ 2.35)

จากข้อมูล ^{13}C NMR spectrum แสดง 29 สัญญาณของ 30 คาร์บอน (ตาราง 16) จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าประกอบด้วย

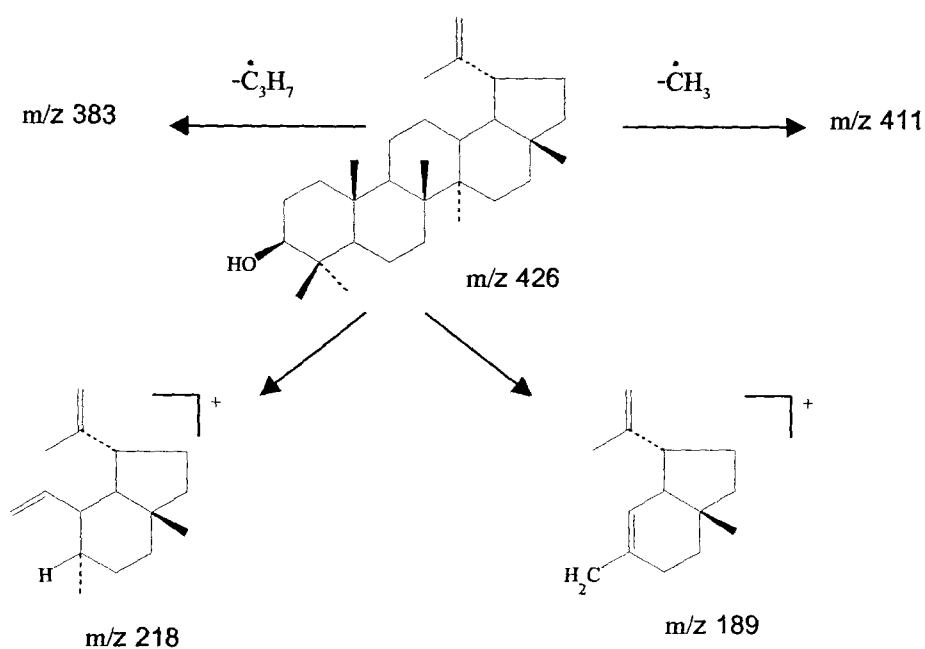
7 methyl carbon ที่ δC 14.5 (C-27), 15.3 (C-24), 15.9 (C-25), 16.1 (C-26), 18.0 (C-28), 19.3 (C-30) และ 28.0 (C-23)

11 methylene carbon ที่ δC 18.3 (C-6), 20.9 (C-11), 25.1 (C-12), 27.4 (C-2), 27.4 (C-15), 29.7 (C-21), 35.6 (C-16), 34.3 (C-7), 38.7 (C-1), 40.0 (C-22) และ 109.3 (C-29)

6 methine carbon ที่ δC 38.0 (C-13), 48.0 (C-18), 48.3 (C-19), 50.4 (C-9), 55.3 (C-5) และ 79.0 (C-3)

6 quaternary carbon ที่ δC 38.8 (C-4), 40.8 (C-8), 37.1 (C-10), 42.8 (C-14), 43.0 (C-17) และ 150.9 (C-20)

EIMS ของสารประกอบ 1 ให้สัญญาณ m/z ที่ 426 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{50}O$ พร้อมกับ fragment ion ที่ m/z 411 218 189 และ 91 จากการเปรียบเทียบข้อมูล IR ^1H NMR ^{13}C NMR (Sookkua, P. 2002 : 27-28) ของ Lupeol (221-223 $^{\circ}C$ Yoshihira, 1971 : 2271-2277) กับ สารประกอบ 1 สรุปได้ว่า สารประกอบ 1 คือ Lupeol เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง Walker-carcinoma-256 พบในพืชสกุล *Diospyros* (Mallavadhani, U.V., Panda, A.K. & Rao, Y.R. 1998 : 901-905) และยังพบในรากของพืช *Minusops elengi* (Misra, G. and Mitra, C. R. 1968 : 501-502) ในใบของพืช *Quercus suber* (Monaco, P & Previtera, L. 1984 : 673-675) และเปลือกของพืช *Crataeva nurvala* Ham. (Sookkua, P. 2002 : 27-28)



ตาราง 16 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ สารประกอบ 1

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
1	38.7		38.7
2	27.4		27.4
3	79.0	79.0	79.0
4	38.8		
5	55.3	55.3	55.3
6	18.3		18.3
7	34.3		34.3
8	40.8		
9	50.4	50.4	50.4
10	37.1		
11	20.9		20.9
12	25.1		25.1
13	38.0	38.0	38.0
14	42.8		
15	27.4		27.4
16	35.6		35.6
17	43.0		
18	48.0	48.0	48.0
19	48.3	48.3	48.3
20	150.9		
21	29.7		29.7
22	40.0		40.0
23	28.0		28.0
24	15.3		15.3
25	15.9		15.9
26	16.1		16.1

ตาราง 16 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
27	14.5		14.5
28	18.0		18.0
29	109.3		109.3
30	19.3		19.3

ตาราง 17 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ 1

δC (ppm)		δH (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
55.3 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.66 (H-5)	CH-5
15.3 (C-24)	$\longleftrightarrow$	0.73 (H-24)	CH_3 -24
18.0 (C-28)	$\longleftrightarrow$	0.76 (H-28)	CH_3 -28
15.9 (C-25)	$\longleftrightarrow$	0.80 (H-25)	CH_3 -25
14.5 (C-27)	$\longleftrightarrow$	0.92 (H-27)	CH_3 -27
28.0 (C-23)	$\longleftrightarrow$	0.94 (H-23)	CH_3 -23
16.1 (C-26)	$\longleftrightarrow$	1.00 (H-26)	CH_3 -26
19.3 (C-30)	$\longleftrightarrow$	1.65 (H-30)	CH_3 -30
29.7 (C-21)	$\longleftrightarrow$	1.82-1.96 (H-21)	CH_2 -21
48.3 (C-19)	$\longleftrightarrow$	2.35 (H-19)	CH-19
79.0 (C-3)	$\longleftrightarrow$	3.16 (H-3)	CH-3
109.3 (C-29)	$\longleftrightarrow$	4.55 4.65 (H-29)	CH_2 -29

ตาราง 18 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ 1

δC (ppm)	ความสัมพันธ์กับ	δH (ppm)
79.0 (C-3)	$\longleftrightarrow$	0.94 (H-23) 0.73 (H-24)
55.3 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.80 (H-25)
48.3 (C-19)	$\longleftrightarrow$	1.82-1.96 (H-21) 4.55 4.65 (H-29) 1.65 (H-30)
29.7 (C-21)	$\longleftrightarrow$	2.35 (H-19)
28.0 (C-23)	$\longleftrightarrow$	0.66 (H-5)
109.3 (C-29)	$\longleftrightarrow$	2.35 (H-19) 1.65 (H-30)
19.3 (C-30)	$\longleftrightarrow$	2.35 (H-19) 4.55 4.65 (H-29)

ตาราง 19 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ สารประกอบ 1 และ Lupeol

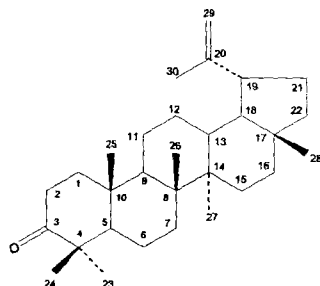
ตำแหน่ง	สารประกอบ 1		Lupeol	
	δC^*	δH^*	δC^{**}	δH^{**}
1	38.7		38.6	
2	27.4		27.4	
3	79.0	3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 5.1$ Hz)	79.0	3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 5.3$ Hz)
4	38.8		38.9	
5	55.3	0.66 (1H, d, $J = 9.1$ Hz)	55.3	0.65 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)
6	18.3		18.3	
7	34.3		34.2	
8	40.8		40.8	
9	50.4		50.4	
10	37.1		37.1	
11	20.9		20.9	
12	25.1		25.1	
13	38.0		38.0	
14	42.8		42.8	
15	27.4		27.4	

ตาราง 19 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 1		Lupeol	
	δC^*	δH^*	δC^{**}	δH^{**}
16	35.6		35.6	
17	43.0		43.0	
18	48.0		48.0	
19	48.3	2.35 (1H, dt, $J = 10.9, 5.5$ Hz)	48.3	2.35 (1H, dt, $J = 11.0, 5.6$ Hz)
20	150.9		151.0	
21	29.7	1.82-1.96 (m)	29.8	1.90 (m)
22	40.0		40.0	
23	28.0	0.94 (3H, s)	28.0	0.94 (3H, s)
24	15.3	0.73 (3H, s)	15.4	0.73 (3H, s)
25	15.9	0.80 (3H, s)	16.1	0.80 (3H, s)
26	16.1	1.00 (3H, s)	16.0	1.01 (3H, s)
27	14.5	0.92 (3H, s)	14.5	0.92 (3H, s)
28	18.0	0.76 (3H, s)	18.0	0.76 (3H, s)
29	109.3	4.65 (br s), 4.55 (br s)	109.3	4.6 (1H, br s), 4.54 (1H, br s)
30	19.3	1.65 (3H, s)	19.3	1.66 (3H, s)

* ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in $CDCl_3$ ** ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in $CDCl_3$ (Sookkua, P. 2002 : 27-28)

สารประกอบ 2



สารประกอบ 2 เป็นของเหลวหนืดสีแดง 12.2 มิลลิกรัม จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารอื่นปนเปื้อน

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $\nu_{\max}$ (CHCl_3) 2927, 2860 cm^{-1} เป็นแถบการยืด C-H และ 1708 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C=O ของ ketone แถบการงอ C-H ของ CH_3 พบที่ 1459 และ 1382

^1H NMR spectrum แสดงสัญญาณของ vinylic proton ตำแหน่งที่ 29 คือ ที่ δ 4.66 (1H, *br s*) และ 4.55 (1H, *br s*) methyl proton ทั้ง 7 หมู่ แสดงสัญญาณ singlet ที่ δ 1.66 (H-30) 1.22 (H-26) 1.04 (H-23) 1.00 (H-24) 0.93 (H-27) 0.90 (H-25) และ 0.77 (H-28)

จาก ^1H - ^1H COSY spectrum มีการ coupling ระหว่าง δ H-21 กับ H-19 (δ 1.82-1.96 และ δ 2.35)

จากข้อมูล ^{13}C NMR spectrum แสดง 30 สัญญาณ ของ 30 คาร์บอน (ตาราง 20) จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าประกอบด้วย

7 methyl carbon ที่ δC 14.4 (C-27), 21.0 (C-24), 15.9 (C-25), 15.7 (C-26), 17.9 (C-28), 19.6 (C-30) และ 26.6 (C-23)

11 methylene carbon ที่ δC 19.2 (C-6), 21.4 (C-11), 34.1 (C-2), 25.1 (C-12), 27.4 (C-15), 29.6 (C-21), 33.5 (C-7), 35.5 (C-16), 39.6 (C-1), 39.9 (C-22) และ 109.3 (C-29)

5 methine carbon ที่ δC 38.1 (C-13), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 49.7 (C-9) และ 54.9 (C-5)

7 quaternary carbon ที่ δC 47.3 (C-4), 40.7 (C-8), 36.8 (C-10), 42.8 (C-14), 42.9 (C-17), 150.8 (C-20) และ 218.2 (C-3)

EIMS ของสารประกอบ 2 ให้สัญญาณ m/z ที่ 424 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ พร้อมกับ fragment ion ที่ m/z 409 218 189 และ 91 จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR (Hisham, A. et al. 1995 : 1227-1231) ของ Lupenone กับสารประกอบ 2 พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน จึงน่าจะสรุปได้ว่า สารประกอบ 2 มีโครงสร้างของสาร Lupenone เป็นส่วนใหญ่

ซึ่ง Lupenone เป็นสารที่เกยพบในพืชหลายชนิดเช่น พืชในสกุล *Diospyros* *maritima* Blume (Higa, Ogihara & Yogi. 1998 : 1189-1193) และยังพบในเปลือกลำต้นของพืช *Salacia* *beddomei* (Hisham, A. et al . 1995 : 1227-1231)

ตาราง 20 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ สารประกอบ 2

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
1	39.6		39.6
2	34.1		34.1
3	218.2		
4	47.3		
5	54.9	54.9	54.9
6	19.2		19.2
7	33.5		33.5
8	40.7		
9	49.7	49.7	49.7
10	36.8		
11	21.4		21.4
12	25.1		25.1
13	38.1		38.1
14	42.8		
15	27.4		27.4
16	35.5		35.5
17	42.9		
18	48.2		48.2
19	47.9		47.9
20	150.8		
21	29.6		29.6
22	39.9		39.9

ตาราง 20 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
23	26.6		26.6
24	21.0		21.0
25	15.9		15.9
26	15.7		15.7
27	14.4		14.4
28	17.9		17.9
29	109.3		109.3
30	19.6		19.6

ตาราง 21 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ 2

δC (ppm)		δH (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
17.9 (C-28)	$\longleftrightarrow$	0.77 (H-28)	CH_3 -28
15.9 (C-25)	$\longleftrightarrow$	0.90 (H-25)	CH_3 -25
14.4 (C-27)	$\longleftrightarrow$	0.93 (H-27)	CH_3 -27
21.0 (C-24)	$\longleftrightarrow$	1.00 (H-24)	CH_3 -24
26.6 (C-23)	$\longleftrightarrow$	1.04 (H-23)	CH_3 -23
15.7 (C-26)	$\longleftrightarrow$	1.22 (H-26)	CH_3 -26
19.6 (C-30)	$\longleftrightarrow$	1.66 (H-30)	CH_3 -30
29.6 (C-21)	$\longleftrightarrow$	1.84-1.97 (H-21)	CH_2 -21
47.9 (C-19)	$\longleftrightarrow$	2.24-2.52 (H-19)	CH-19
109.3 (C-29)	$\longleftrightarrow$	4.55 4.66 (H-29)	CH_2 -29

ตาราง 22 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ 2

δC (ppm)	ความสัมพันธ์กับ	δH (ppm)
218.2 (C-3)	$\longleftrightarrow$	1.04 (H-23) 1.00 (H-24)
54.9 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.90 (H-25)
47.9 (C-19)	$\longleftrightarrow$	1.84-1.97 (H-21) 4.55 4.66 (H-29) 1.66 (H-30)
29.6 (C-21)	$\longleftrightarrow$	2.24-2.52 (H-19) 1.66 (H-30)
109.3 (C-29)	$\longleftrightarrow$	2.24-2.52 (H-19) 1.66 (H-30)
19.6 (C-30)	$\longleftrightarrow$	2.24-2.52 (H-19) 4.55 4.66 (H-29)

ตาราง 23 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ สารประกอบ 2 และ Lupenone

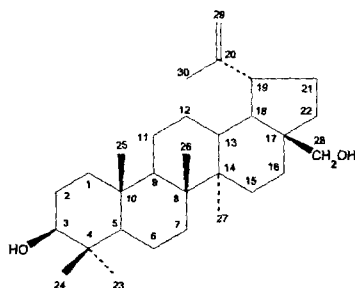
ตำแหน่ง	สารประกอบ 2		Lupenone	
	δC^*	δH^*	δC^{**}	δH^{**}
1	39.6		39.6	
2	34.1		34.1	
3	218.2		217.9	
4	47.3		47.3	
5	54.9		54.9	
6	19.2		19.7	
7	33.5		33.6	
8	40.7		40.8	
9	49.7		49.8	
10	36.8		36.9	
11	21.4		21.5	
12	25.1		25.1	
13	38.1		37.4	
14	42.8		42.8	
15	27.4		27.4	

ตาราง 23 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 2		Lupenone	
	δC^*	δH^*	δC^{**}	δH^{**}
16	35.5		35.6	
17	42.9		43.0	
18	48.2		48.3	
19	47.9	2.24-2.52 (m)	47.9	2.35 (1H, dt, $J = 11.0, 5.6$ Hz)
20	150.8		150.8	
21	29.6	1.84-1.97 (m)	29.8	1.90 (m)
22	39.9		40.0	
23	26.6	1.04 (3H, s)	26.6	1.08 (3H, s)
24	21.0	1.00 (3H, s)	21.0	1.04 (3H, s)
25	15.9	0.90 (3H, s)	15.9	0.94 (3H, s)
26	15.7	1.22 (3H, s)	15.8	1.08 (3H, s)
27	14.4	0.93 (3H, s)	14.5	0.96 (3H, s)
28	17.9	0.77 (3H, s)	18.0	0.80 (3H, s)
29	109.3	4.66 (br s), 4.55 (br s)	109.4	4.63 (1H, br s), 4.58 (1H, br s)
30	19.6	1.65 (3H, s)	19.3	1.68 (3H, s)

* ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in $CDCl_3$ ** ^1H NMR 270 MHz ^{13}C NMR 67.9 MHz in $CDCl_3$, (Hisham, A. 1995 : 1227-1231)

สารประกอบ 3



สารประกอบ 3 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 39.1 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 237-240 °C

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $\nu_{\max}$ (CHCl₃) 3396 cm⁻¹ เป็นแถบการยืดของ O-H ส่วน 2941, 2862 cm⁻¹ เป็นแถบการยืด C-H และ 1643 cm⁻¹ เป็นแถบการยืดของ C=C ของ terminal methylene แถบการงอ C-H ของ CH₃ พบที่ 1454, 1375 ส่วน 1027 cm⁻¹ เป็นแถบการยืดของ C-O

¹H NMR spectrum แสดงสัญญาณของ vinylic proton ตำแหน่งที่ 29 คือ ที่ δ 4.65 (1H, *br s*) และ 4.55 (1H, *br s*) และพบสัญญาณระบบ AB ของ methylene proton (H-28) ที่ δ 3.77 (1H, *d*, $J = 10.7$ Hz) และ 3.30 (1H, *d*, $J = 10.8$ Hz) สัญญาณ doublet ที่ δ 0.65 ($J = 9.4$ Hz) เป็นของ methine proton ตำแหน่ง 5 ส่วนสัญญาณที่ δ 3.16 (1H, *dd*, $J = 10.8, 4.9$ Hz) เป็นของ axial proton ตำแหน่ง 3 และ methyl proton ทั้ง 6 หมู่ แสดงสัญญาณ singlet ที่ δ 1.65 (H-30) 0.99 (H-26) 0.95 (H-23) 0.94 (H-27) 0.79 (H-25) และ 0.73 (H-24)

จาก ¹H - ¹H COSY spectrum มีการ coupling ระหว่าง H-28 กับ H-28 (δ 3.31 และ δ 3.77)

จากข้อมูล ¹³C NMR spectrum แสดง 29 สัญญาณของ 30 คาร์บอน (ตาราง 24) จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าประกอบด้วย

6 methyl carbon ที่ δ C 14.7 (C-27), 15.3 (C-24), 15.9 (C-26), 16.0 (C-25), 19.0 (C-30) และ 27.9 (C-23)

12 methylene carbon ที่ δ C 18.2 (C-6), 20.8 (C-11), 25.2 (C-12), 27.0 (C-15), 27.3 (C-2), 29.1 (C-16), 29.7 (C-21), 33.9 (C-22), 34.2 (C-7), 38.6 (C-1), 60.5 (C-28) และ 109.6 (C-29)

6 methine carbon ที่ δ C 37.1 (C-13), 47.7 (C-18), 48.7 (C-19), 50.3 (C-9), 55.2 (C-5) และ 78.9 (C-3)

6 quaternary carbon ที่ δ c 39.3 (C-4), 40.9 (C-8), 37.3 (C-10), 42.7 (C-14), 47.7 (C-17) และ 150.7 (C-20)

EIMS ของสารประกอบ 3 ให้สัญญาณ molecular ion m/z ที่ 442 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{50}O_2$ พร้อมกับ fragment ion ที่ m/z 411 203 91 และ 77 จากการเปรียบเทียบข้อมูล IR ^1H NMR ^{13}C NMR (Aunchai, N. 2002 : 44-49) ของ Betulin (236-238 $^{\circ}C$ Tinto et al, 1992 : 395-398) กับสารประกอบ 3 พบว่าข้อมูลคล้ายคลึงกัน สรุปได้ว่า สารประกอบ 3 คือ Betulin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง Walker carcinoma- 256 พบในพืชสกุล *Diospyros* (Mallavadhani, U.V. ,Panda, A.K. & Rao, Y.R. 1998 : 901-905) และยังพบในลำต้นของ *Salacia cordata* (Tinto, W. F. et al. 1992 : 395-398) พบในลำต้นของ *Plantanus x hybrida* (Aplin, R. T., Halsall, T. G. & Norin, T. 1963 : 3269-3273)

ตาราง 24 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 3

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
1	38.6		38.6
2	27.3		27.3
3	78.9	78.9	78.9
4	39.3		
5	55.2	55.2	55.2
6	18.2		18.2
7	34.2		34.2
8	40.9		
9	50.3	50.3	50.3
10	37.3		
11	20.8		20.8
12	25.2		25.2
13	37.1	37.1	37.1
14	42.7		
15	27.0		27.0
16	29.1		29.1
17	47.7		

ตาราง 24 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_{C}	DEPT 90 δ_{C}	DEPT 135 δ_{C}
18	47.7	47.7	47.7
19	48.7	48.7	48.7
20	150.4		
21	29.7		29.7
22	33.9		33.9
23	27.9		27.9
24	15.3		15.3
25	16.0		16.0
26	15.9		15.9
27	14.7		14.7
28	60.5		60.5
29	109.6		109.6
30	19.0		19.0

ตาราง 25 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ 3

δ_{C} (ppm)		δ_{H} (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
55.2 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.65 (H-5)	CH-5
15.3 (C-24)	$\longleftrightarrow$	0.73 (H-24)	CH_3 -24
16.0 (C-25)	$\longleftrightarrow$	0.79 (H-25)	CH_3 -25
14.7 (C-27)	$\longleftrightarrow$	0.94 (H-27)	CH_3 -27
27.9 (C-23)	$\longleftrightarrow$	0.95 (H-23)	CH_3 -23
15.9 (C-26)	$\longleftrightarrow$	0.99 (H-26)	CH_3 -26
19.0 (C-30)	$\longleftrightarrow$	1.65 (H-30)	CH_3 -30

ตาราง 25 (ต่อ)

δC (ppm)	δH (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
48.7 (C-19) $\leftrightarrow$	2.35 (H-19)	CH-19
78.9 (C-3) $\leftrightarrow$	3.16 (H-3)	CH-3
60.5 (C-28) $\leftrightarrow$	3.30 3.77 (H-28)	CH ₂ -28
109.6 (C-29) $\leftrightarrow$	4.65 4.56 (H-29)	CH ₂ -29

ตาราง 26 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ 3

δC (ppm)	ความสัมพันธ์กับ	δH (ppm)
78.9 (C-3)	$\leftrightarrow$	0.95 (H-23) 0.73 (H-24)
55.2 (C-5)	$\leftrightarrow$	0.79 (H-25)
48.7 (C-19)	$\leftrightarrow$	4.55 4.65 (H-29) 1.65 (H-30)
27.9 (C-23)	$\leftrightarrow$	3.16 (H-3) 0.65 (H-5) 0.73 (H-24)
15.3 (C-24)	$\leftrightarrow$	3.16 (H-3) 0.65 (H-5) 0.95 (H-23)
16.0 (C-25)	$\leftrightarrow$	0.65 (H-5)
109.6 (C-29)	$\leftrightarrow$	2.35 (H-19) 1.65 (H-30)
19.0 (C-30)	$\leftrightarrow$	2.35 (H-19) 4.55 4.65 (H-29)

ตาราง 27 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ สารประกอบ 3 และ Betulin

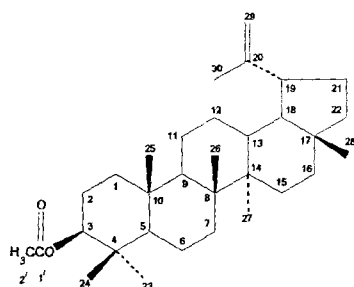
ตำแหน่ง	สารประกอบ 3		Betulin	
	δC^*	δH^*	δC^{**}	δH^{**}
1	38.6		38.7	
2	27.3		27.4	
3	78.9	3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 4.9$ Hz)	79.1	3.16 (1H, dd, $J = 10.6, 5.0$ Hz)
4	39.3		38.8	
5	55.2	0.65 (1H, d, $J = 9.4$ Hz)	55.3	0.71 (1H, d, $J = 9.4$ Hz)
6	18.2		18.3	

ตาราง 27 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 3		Betulin	
	δ_C^*	δ_H^*	δ_C^{**}	δ_H^{**}
7	34.2		34.3	
8	40.9		41.0	
9	50.3		50.5	
10	37.3		37.3	
11	20.8		20.9	
12	25.2		25.2	
13	37.1		37.2	
14	42.7		42.8	
15	27.0		27.1	
16	29.1		29.2	
17	47.7		47.9	
18	47.7		47.9	
19	48.7	2.35 (1H, dt, $J = 10.5, 6.2$ Hz)	48.8	2.36 (1H, dt, $J = 10.6, 6.0$ Hz)
20	150.4		150.5	
21	29.7		29.8	
22	33.9		34.0	
23	27.9	0.95 (3H, s)	28.1	0.95 (3H, s)
24	15.3	0.73 (3H, s)	15.4	0.74 (3H, s)
25	16.0	0.79 (3H, s)	16.1	0.80 (3H, s)
26	15.9	0.99 (3H, s)	16.1	1.00 (3H, s)
27	14.7	0.94 (3H, s)	14.8	0.96 (3H, s)
28	60.5	3.30 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) 3.77 (1H, d, $J = 10.7$ Hz)	60.6	3.31 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) 3.78 (1H, d, $J = 10.8$ Hz)
29	109.6	4.65 (1H, br s), 4.55 (1H, br s)	109.7	4.66 (1H, br s), 4.56 (1H, br s)
30	19.0	1.65 (3H, s)	19.1	1.66 (3H, s)

* ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 ** ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 (Aunchai, N. 2002 : 44-49)

สารประกอบ 4



สารประกอบ 4 เป็นของแข็งสีขาวหนัก 50.9 mg จุดหลอมเหลว 190-192 °C

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $\nu_{\max}$ (CHCl₃) 2942, 2866 cm⁻¹ เป็นแถบการยืด C-H ที่ 1735 cm⁻¹ เป็นแถบการยืดของ C=O ของ ester ที่ 1451, 1379 เป็นแถบการงอ C-H ของ CH₃ ส่วนที่ 1243 และ 1027 cm⁻¹ เป็นแถบการยืดของ C-O ของ acetate

¹H NMR spectrum แสดงสัญญาณของ vinylic proton ตำแหน่งที่ 29 คือ ที่ δ 4.66 (1H, *br s*) และ 4.54 (1H, *br s*) ส่วนสัญญาณที่ δ 4.44 (1H, dd, $J = 10.8, 5.8$ Hz) เป็นของ oxymethine ที่ต่อกับหมู่ O-acetyl ที่ตำแหน่ง 3 methine proton H-5 แสดงที่ δ 0.76 (d, $J = 10.8, 5.8$ Hz) และ methyl proton ทั้ง 8 หมู่ แสดงสัญญาณ singlet ที่ δ 1.66 (H-30) 1.00 (H-26) 0.82 (H-23) 0.91 (H-27) 0.82 (H-25) 0.81 (H-28) 0.82 (H-24) และ 2.01 (H-2')

จาก ¹H - ¹H COSY spectrum มีการ coupling ระหว่าง H-19 กับ H-21 (δ 2.33 และ δ 1.82-1.93)

จากข้อมูล ¹³C NMR spectrum แสดง 32 สัญญาณของ 32 คาร์บอน (ตาราง 28) จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าประกอบด้วย

8 methyl carbon ที่ δ C 14.5 (C-27), 15.9 (C-24), 16.1 (C-25), 16.4 (C-26), 17.9 (C-28), 19.0 (C-30), 28.2 (C-23) และ 21.3 (C-2')

11 methylene carbon ที่ δ C 18.1 (C-6), 20.9 (C-11), 25.0 (C-12), 23.7 (C-2), 27.4 (C-15), 29.8 (C-21), 35.5 (C-16), 34.2 (C-7), 38.3 (C-1), 39.9 (C-22) และ 109.3 (C-29)

6 methine carbon ที่ δ C 38.0 (C-13), 48.0 (C-18), 48.2 (C-19), 50.3 (C-9), 55.3 (C-5) และ 80.9 (C-3)

6 quaternary carbon ที่ δ C 37.7 (C-4), 40.8 (C-8), 37.0 (C-10), 42.8 (C-14), 42.9 (C-17) และ 150.9 (C-20)

EIMS ของสารประกอบ 4 ให้สัญญาณ molecular ion m/z ที่ 468 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล C₃₂H₅₂O₂ พร้อมกับ fragment ion ที่ m/z 396 255 218 189 และ 91 จากการเปรียบเทียบข้อมูล

IR (Argay, G. et al. 1997 : 169-179) ^1H NMR (Sumanasrethakul, C. 1972 : 44) ^{13}C NMR (Byla, B. & Herz, W. 1996 : 501-504) ของ Lupeol acetate (214-215 $^{\circ}\text{C}$ Sumanasrethakul, C. 1972 : 44) ก็ สารประกอบ 4 พบว่าข้อมูลคล้ายคลึงกัน สรุปได้ว่า สารประกอบ 4 คือ Lupeol acetate ซึ่งเป็น สารที่เคพบในพืชหลายชนิดเช่น พืชในสกุล *Diospyros* มีฤทธิ์ยับยั้งความเครียดที่เกิดในหนู (Mallavadhani, U.V., Panda, A. K. & Rao, Y.R. 1998 : 901-905) และยังพบในพืชสกุล *Hieracium plumulisum* (Argay, G. et al 1997 : 169-179) และพบในรากของพืช *Minusops elengi* (Misra, G. and Mitra, C. R. 1968 : 501-502)

ตาราง 28 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ สารประกอบ 4

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
1	38.3		38.3
2	23.7		23.7
3	80.9	80.9	80.9
4	37.7		
5	55.3	55.3	55.3
6	18.1		18.1
7	34.2		34.2
8	40.8		
9	50.3	50.3	50.3
10	37.0		
11	20.9		20.9
12	25.0		25.0
13	38.0	38.0	38.0
14	42.8		
15	27.4		27.4
16	35.5		35.5
17	42.9		
18	48.0	48.0	48.0

ตาราง 28 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
19	48.2	48.2	48.2
20	150.9		
21	29.8		29.8
22	39.9		39.9
23	28.2		28.2
24	15.9		15.9
25	16.1		16.1
26	16.4		16.4
27	14.5		14.5
28	17.9		17.9
29	109.3		109.3
30	19.0		19.0
1'	171.0		
2'	21.3		21.3

ตาราง 29 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ 4

δC (ppm)	δH (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
21.3 (C-2') $\longleftrightarrow$	2.01 (H-2')	CH_3 ของ 2'
55.3 (C-5) $\longleftrightarrow$	0.76 (H-5)	CH-5
15.9 (C-24) $\longleftrightarrow$	0.82 (H-24)	CH_3 -24
17.9 (C-28) $\longleftrightarrow$	0.81 (H-28)	CH_3 -28
16.1 (C-25) $\longleftrightarrow$	0.82 (H-25)	CH_3 -25
14.5 (C-27) $\longleftrightarrow$	0.91 (H-27)	CH_3 -27
28.2 (C-23) $\longleftrightarrow$	0.82 (H-23)	CH_3 -23
16.4 (C-26) $\longleftrightarrow$	1.00 (H-26)	CH_3 -26

ตาราง 29 (ต่อ)

δC (ppm)	δH (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
19.0 (C-30) $\longleftrightarrow$	1.66 (H-30)	CH ₃ -30
29.8 (C-21) $\longleftrightarrow$	1.82-1.93 (H-21)	CH ₂ -21
48.2 (C-19) $\longleftrightarrow$	2.33 (H-19)	CH-19
80.9 (C-3) $\longleftrightarrow$	4.44 (H-3)	CH-3
109.3 (C-29) $\longleftrightarrow$	4.54 4.66 (H-29)	CH ₂ -29

ตาราง 30 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ 4

δC (ppm)	ความสัมพันธ์กับ	δH (ppm)
80.9 (C-3)	$\longleftrightarrow$	0.82 (H-23) 0.82 (H-24)
55.3 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.82 (H-25)
48.2 (C-19)	$\longleftrightarrow$	1.82-1.93 (H-21) 4.54 4.66 (H-29) 1.66 (H-30)
29.8 (C-21)	$\longleftrightarrow$	2.33 (H-19)
16.1 (C-25)	$\longleftrightarrow$	0.76 (H-5)
109.3 (C-29)	$\longleftrightarrow$	2.33 (H-19) 1.66 (H-30)
19.0 (C-30)	$\longleftrightarrow$	2.33 (H-19) 4.54 4.66 (H-29)
171.0 (C-1')	$\longleftrightarrow$	2.01 (H-2')

ตาราง 31 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ สารประกอบ 4 และ Lupeol acetate

ตำแหน่ง	สารประกอบ 4		Lupeol acetate	
	δC^*	δH^*	δC^{***}	δH^{**}
1	38.3		38.3	
2	23.7		23.6	
3	80.9	4.44 (1H, dd, $J = 10.8, 5.8$ Hz)	80.9	4.33 (1H, $J = 5$ Hz)
4	37.7		37.7	
5	55.3	0.76 (d, $J = 9.0$ Hz)	55.3	

ตาราง 31 (ต่อ)

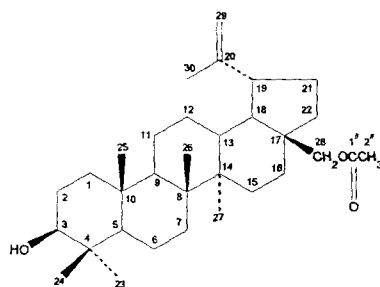
ตำแหน่ง	สารประกอบ 4		Lupeol acetate	
	δ_C^*	δ_H^*	δ_C^{***}	δ_H^{**}
6	18.1		18.1	
7	34.2		34.1	
8	40.8		40.0	
9	50.3		50.5	
10	37.0		37.0	
11	20.9		20.9	
12	25.0		25.0	
13	38.0		38.0	
14	42.8		42.0	
15	27.4		27.4	
16	35.5		35.5	
17	42.9		42.0	
18	48.0		47.9	
19	48.2	2.33 (1H, dt, $J = 11.1, 5.6$ Hz)	48.2	ไม่ได้รายงานไว้
20	150.9		150.9	
21	29.8	1.82-1.93 (m)	29.0	ไม่ได้รายงานไว้
22	39.9		39.9	
23	28.2	0.82 (3H, s)	27.9	0.85 (3H, s)
24	15.9	0.82 (3H, s)	15.9	0.85 (3H, s)
25	16.1	0.82 (3H, s)	16.1	0.85 (3H, s)
26	16.4	1.00 (3H, s)	16.3	0.94 (3H, s)
27	14.5	0.91 (3H, s)	14.4	1.03 (3H, s)
28	17.9	0.81 (3H, s)	17.9	0.79 (3H, s)
29	109.3	4.66 (br s), 4.54 (br s)	109.3	4.62 (2H br s)
30	19.0	1.66 (3H, s)	19.2	1.69 (3H, s)
1'	171.0		171.0	

ตาราง 31 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 4		Lupeol acetate	
	δ_c^*	δ_H^*	δ_c^{***}	δ_H^{**}
2'	21.3	2.01 (3H, s)	21.3	2.02 (3H, s)

* ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 ** ^1H NMR in CDCl_3 (Sumanasrethakul, C. 1972 : 44)*** ^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 (Argay, G.et al. 1997 : 161-179)

สารประกอบ 5



สารประกอบ 5 เป็นของแข็งสีขาว หนัก 81.4 mg mp 209-210 $^{\circ}\text{C}$

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ ν_{max} (CHCl_3) 3587 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ O-H ส่วน 2942, 2868 cm^{-1} เป็นแถบการยืด C-H และ 1739 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C=O ของ ester ที่ 1458, 1388 แถบการงอ C-H ของ CH_3 ส่วน 1239 และ 1033 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C-O ของ acetate

^1H NMR spectrum แสดงสัญญาณของ vinylic proton ตำแหน่งที่ 29 คือ ที่ δ 4.66 (1H, *br s*) และ 4.56 (1H, *br s*) และพบสัญญาณระบบ AB ของ methylene proton ตำแหน่งที่ 28 ที่ δ 3.83 (1H, d, $J = 11.0$ Hz) และ δ 4.22 (1H, d, $J = 11.0$ Hz) ส่วนสัญญาณที่ δ 3.16 (1H, dd, $J = 10.3, 4.8$ Hz) เป็นของ axial proton ตำแหน่ง 3 methine proton H-5 ปรากฏที่ δ 0.65 (1H, d, $J = 9.0$ Hz) และ methyl proton ทั้ง 7 หมู่ แสดงสัญญาณ singlet ที่ δ 1.65 (H-30) 0.80 (H-26) 0.94 (H-23) 0.95 (H-27) 0.73 (H-25) 1.00 (H-24) สำหรับ methyl proton ของ หมู่ acetoxy แสดงที่ δ 2.04 (H-2'')

จาก ^1H - ^1H COSY spectrum มีการ coupling ของ vicinal proton ตำแหน่งที่ 28 (δ 3.83 และ δ 4.22)

จากข้อมูล ^{13}C NMR spectrum แสดง 30 สัญญาณของ 32 คาร์บอน (ตาราง 32) จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าประกอบด้วย

7 methyl carbon ที่ δC 14.7 (C-27), 15.3 (C-24), 16.0 (C-26), 16.0 (C-25), 19.1 (C-30) 27.9 (C-23) และ 21.0 (C-2'')

12 methylene carbon ที่ δC 18.2 (C-6), 20.7 (C-11), 25.1 (C-12), 27.0 (C-15), 27.3 (C-2), 29.5 (C-16), 29.7 (C-21), 34.1 (C-22), 34.5 (C-7), 38.7 (C-1), 62.8 (C-28) และ 109.8 (C-29)

6 methine carbon ที่ δC 37.5 (C-13), 47.6 (C-18), 48.7 (C-19), 50.3 (C-9), 55.2 (C-5) และ 78.9 (C-3)

7 quaternary carbon ที่ δC 38.8 (C-4), 40.8 (C-8), 38.7 (C-10), 42.6 (C-14), 46.3 (C-17) และ 150.1 (C-20) และ 171.6 (C=O) ตำแหน่งที่ 1''

EIMS ของสารประกอบ 5 ให้สัญญาณ molecular ion m/z ที่ 484 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$ พร้อมกับ fragment ion ที่ m/z 466 411 216 189 และ 91 และจากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR (Kuo, Y. H., Chang, C. I., & Kuo, Y. H. 1997 : 1135-1137) ของ 28-acetyl-3-(*E*)-coumaroylbetulin กับสารประกอบ 5 พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่สอดคล้องกัน ต่างกันที่ตำแหน่ง 1'-9' สรุปได้ว่า สารประกอบ 5 คือ 28-acetylbetulin ซึ่งเป็นสารที่เคยพบในพืชหลายชนิด เช่น พืชในสกุล *Diospyros*

ตาราง 32 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ สารประกอบ 5

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
1	38.7		38.7
2	27.3		27.3
3	78.9	78.9	78.9
4	38.8		
5	55.2	55.2	55.2
6	18.2		18.2
7	34.5		34.5
8	40.8		

ตาราง 32 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ_c	DEPT 90 δ_c	DEPT 135 δ_c
9	50.3	50.3	50.3
10	38.7		
11	20.7		20.7
12	25.1		25.1
13	37.5	37.5	37.5
14	42.6		
15	27.0		27.0
16	29.5		29.5
17	46.3		
18	47.6	47.6	47.6
19	48.7	48.7	48.7
20	150.1		
21	29.7		29.7
22	34.1		34.1
23	27.9		27.9
24	15.3		15.3
25	16.0		16.0
26	16.0		16.0
27	14.7		14.7
28	62.8		62.8
29	109.8		109.8
30	19.1		19.1
1''	171.6		
2''	21.0		21.0

ตาราง 33 ข้อมูล HMQC spectrum ของสารประกอบ 5

δC (ppm)		δH (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
21.0 (C-2 ^{''})	$\longleftrightarrow$	2.04 (H-2 ^{''})	CH ₃ ของ 2 ^{''}
55.2 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.65 (H-5)	CH-5
16.0 (C-25)	$\longleftrightarrow$	0.73(H-25)	CH ₃ -25
16.0 (C-26)	$\longleftrightarrow$	0.80 (H-26)	CH ₃ -26
27.9 (C-23)	$\longleftrightarrow$	0.94 (H-23)	CH ₃ -23
14.7 (C-27)	$\longleftrightarrow$	0.95 (H-27)	CH ₃ -27
15.3 (C-24)	$\longleftrightarrow$	1.00 (H-24)	CH ₃ -24
19.1 (C-30)	$\longleftrightarrow$	1.65 (H-30)	CH ₃ -30
48.7 (C-19)	$\longleftrightarrow$	2.42 (H-19)	CH-19
78.9 (C-3)	$\longleftrightarrow$	3.16 (H-3)	CH-3
62.8 (C-20)	$\longleftrightarrow$	3.83 4.22 (H-28)	CH ₂ -28
109.8 (C-29)	$\longleftrightarrow$	4.56 4.66 (H-29)	CH ₂ -29

ตาราง 34 ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ 5

δC (ppm)	ความสัมพันธ์กับ	δH (ppm)
78.9 (C-3)	$\longleftrightarrow$	0.94 (H-23) 1.00 (H-24)
55.2 (C-5)	$\longleftrightarrow$	0.73 (H-25)
48.7 (C-19)	$\longleftrightarrow$	4.54 4.66 (H-29) 1.65 (H-30)
27.9 (C-23)	$\longleftrightarrow$	3.16 (H-3) 0.65 (H-5) 1.00 (H-24)
15.3 (C-24)	$\longleftrightarrow$	3.16 (H-3) 0.65 (H-5) 0.94 (H-23)
16.0 (C-25)	$\longleftrightarrow$	0.76 (H-5)
109.3 (C-29)	$\longleftrightarrow$	2.42 (H-19) 1.65 (H-30)
19.1 (C-30)	$\longleftrightarrow$	2.42 (H-19) 4.55 4.66 (H-29)
171.6 (C-1 ^{''})	$\longleftrightarrow$	2.04 (H-2 ^{''})

ตาราง 35 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ สารประกอบ 5 และ 28-acetyl-3-(*E*)-coumaroylbetulin

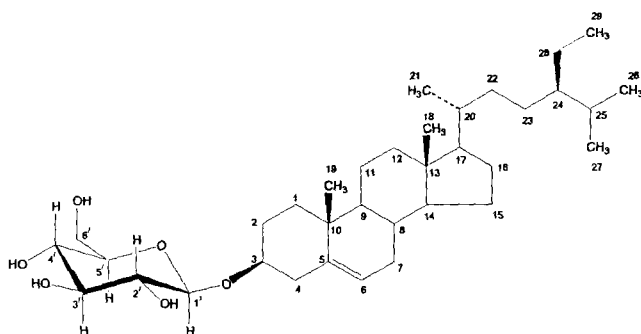
ตำแหน่ง	สารประกอบ 5		28-acetyl-3-(<i>E</i>)-coumaroylbetulin	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{'}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{'}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{'}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{'}}$
1	38.7		38.4	
2	27.3		23.8	
3	78.9	3.16 (1H, dd, $J = 10.3, 4.8$ Hz)	80.8	4.61 (m)
4	38.8		38.0	
5	55.2	0.65 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)	55.4	
6	18.2		18.2	
7	34.5		34.1	
8	40.8		40.9	
9	50.3		50.3	
10	38.7		37.1	
11	20.7		20.8	
12	25.1		25.2	
13	37.5		37.6	
14	42.6		42.7	
15	27.0		27.1	
16	29.5		29.6	
17	46.3		46.3	
18	47.6		48.8	
19	48.7	2.42 (1H, dt, $J = 10.8, 5.8$ Hz)	47.7	2.41 (m)
20	150.1		150.1	
21	29.7		29.7	
22	34.1		35.5	
23	27.9	0.94 (3H, s)	28.0	0.86 (3H, s)
24	15.3	1.00 (3H, s)	16.0	1.01 (3H, s)
25	16.0	0.73 (3H, s)	16.2	0.85 (3H, s)
26	16.0	0.80 (3H, s)	16.7	0.89 (3H, s)

ตาราง 35 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 5		28-acetyl-3-(<i>E</i>)-coumaroylbetulin	
	δ_C^*	δ_H^*	δ_C^{**}	δ_H^{**}
27	14.7	0.95 (3H, s)	14.7	0.95 (3H, s)
28	62.8	3.83 (1H, d, $J = 11.0$ Hz) 4.22 (1H, d, $J = 11.0$ Hz)	62.9	3.82 (1H, d, $J = 10.6$ Hz) 4.24 (1H, d, $J = 10.6$ Hz)
29	109.8	4.56 (1H, br s) 4.66 (1H, br s)	109.9	4.57 (1H, br s) 4.66 (1H, br s)
30	19.1	1.65 (3H, s)	19.1	1.67 (3H, s)
1'			127.5	
2'			129.9	7.41
3'			115.8	6.82 (d, $J = 8.6$ Hz)
4'			157.4	
5'			115.8	6.82 (d, $J = 8.6$ Hz)
6'			129.9	7.41 (d, $J = 8.6$ Hz)
7'			143.8	7.57 (d, $J = 16.0$ Hz)
8'			116.4	6.26 (d, $J = 16.0$ Hz)
9'			167.2	
1''	171.6		171.8	
2''	21.0	2.04 (3H, s)	21.1	2.03 (3H, s)

* ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 ** ^1H NMR ^{13}C NMR in CDCl_3 (Kuo, Y. H., Chang, C. I., & Kuo, Y. H. 1997 : 1135-1137)

สารประกอบ 6



สารประกอบ 6 เป็นของแข็งสีขาว น้หนัก 5.1 mg mp 285-287 °C

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $\nu_{\max}(\text{CHCl}_3)$ 3385 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ O-H ส่วน 2938 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C-H และที่ 1458, 1436 เป็นการยืด C-H ของ CH_3 ส่วน 1030 cm^{-1} เป็นแถบการยืดของ C-O

^1H NMR spectrum แสดงสัญญาณของหมู่ methyl ทั้ง 6 หมู่ที่ δ 0.61-0.94 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ methylene และ methine ที่ δ 1.18-2.30 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.22 เป็นของ H-3 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.34 (d, 7.5 Hz) เป็นสัญญาณของ anomeric proton และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.22-3.76 เป็นสัญญาณของ glucosidic proton สำหรับ H-6 ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.29

จากข้อมูล ^{13}C NMR spectrum แสดง 35 คาร์บอน (ตาราง 36) จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าประกอบด้วย

6 methyl carbon ที่ δC 11.7 (C-18), 18.9 (C-19), 19.7 (C-21), 18.7 (C-26), 19.2 (C-27) และ 11.8 (C-29)

12 methylene carbon ที่ δC 20.9 (C-11), 22.9 (C-15), 24.2 (C-28), 25.9 (C-23), 28.1 (C-16), 29.5 (C-2), 31.8 (C-7), 33.8 (C-22), 37.1 (C-1), 42.2 (C-12), 45.7 (C-4), และ 61.9 (C-6')

14 methine carbon ที่ δC 29.0 (C-25), 36.0 (C-8), 39.6 (C-20), 49.9 (C-9), 55.9 (C-17), 55.9 (C-24), 56.8 (C-14), 70.0 (C-4'), 70.3 (C-3), 73.4 (C-2'), 75.5 (C-3'), 76.2 (C-5'), 101.0 (C-1') และ 122.2 (C-6)

3 quaternary carbon ที่ δC 45.7 (C-5), 36.6 (C-10) และ 45.7 (C-13)

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR (Sakakibara, J. 1983 : 2553-2555) ของ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside (286 °C Misra, G. and Mitra, C. R. 1965 : 345-348) กับ สารประกอบ 6 ดังตาราง 37 พบว่าข้อมูลคล้ายคลึงกัน สรุปได้ว่าสารประกอบ 6 คือ β -sitosteryl-

3-*O*- β -D-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารที่เคยพบในพืชหลายชนิดเช่น พืชในสกุล *Diospyros* พบในใบของพืช *Enkiathus cernuus* (Sakakibara, J. 1983 : 2553-2555) พบในแก่นและรากของพืช *Minusops elengi* (Misra, G. and Mitra, C. R. 1968 : 501-502) พบในผลและเมล็ดของพืช *Minusops hexanadra* (Misra, G. and Mitra, C. R. 1965 : 345-348)

ตาราง 36 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ สารประกอบ 6

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
1	37.1		37.1
2	29.5		29.5
3	70.0	70.0	70.0
4	45.7		45.7
5	140.1		
6	122.2	122.2	122.2
7	31.8		31.8
8	36.0	36.0	36.0
9	49.9	49.9	49.9
10	36.5		
11	20.9		20.9
12	42.2		42.2
13	45.7		
14	56.6	56.6	56.6
15	22.9		22.9
16	28.1		28.1
17	55.9	55.9	55.9
18	11.7		11.7
19	18.9		18.9
20	39.6	39.6	39.6
21	19.7		19.7

ตาราง 36 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δC	DEPT 90 δC	DEPT 135 δC
22	33.8		33.8
23	25.9	25.9	25.9
24	55.9	55.9	55.9
25	29.0	29.0	29.0
26	18.7		18.7
27	19.2		19.2
28	24.2		24.2
29	11.8		11.8
1'	101.0	101.0	101.0
2'	73.4	73.4	73.4
3'	75.5	75.5	75.5
4'	70.0	70.0	70.0
5'	76.2	76.2	76.2
6'	61.9		61.9

ตาราง 37 ข้อมูล ^{13}C NMR ของ สารประกอบ 6 และ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside

ตำแหน่ง	สารประกอบ 6 δC^*	β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside δC^{**}
1	37.1	37.5
2	29.5	30.2
3	70.0	70.5
4	45.7	42.0
5	140.1	140.9
6	122.2	121.8
7	31.8	32.1

ตาราง 37 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 6	β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside
	δC^*	δC^{**}
8	36.0	32.1
9	49.9	50.3
10	36.5	36.9
11	20.9	21.3
12	42.2	39.3
13	45.7	42.5
14	56.6	56.9
15	22.9	24.5
16	28.1	28.6
17	55.9	56.3
18	11.7	12.0
19	18.9	19.4
20	39.6	36.4
21	19.7	19.1
22	33.8	34.3
23	25.9	26.5
24	55.9	46.1
25	29.0	29.5
26	18.7	19.2
27	19.2	20.0
28	24.2	23.4
29	11.8	12.2
1'	101.0	102.5
2'	73.4	75.2
3'	75.5	78.3
4'	70.0	71.4

ตาราง 37 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 6	<i>β</i> -sitosteryl-3-O- <i>β</i> -D-glucopyranoside
	δC^*	δC^{**}
5'	76.2	78.2
6'	61.9	62.8

* ^1H NMR 300 MHz ^{13}C NMR 75 MHz in $CDCl_3$ + MeOH

** ^{13}C NMR 50, 25 MHz in pyridine (Sakakibara, J. 1983 : 2553-2555)

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ลีนา ผู้พัฒนาพงศ์. (2530). *สมุนไพรตอนที่ 5*. กรุงเทพฯ : ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นันทวัน บุญยะประกฤษ และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2541). *สมุนไพรพื้นบ้าน (3)*. กรุงเทพฯ : ประชาชน.
- นิจศิริ เรืองรังศรี และพยอม ดันติวัฒน์. (2534). *พืชสมุนไพร*. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- Aunchai, N. (2002). Study on the chemical constituents of *Zizyphus oenopia* (Linn.) Mill. Root. Master Thesis, M.S. (Biological Chemistry). Bangkok : Graduate School Srinakharinwirot University. Photocopied.
- Argay, G. et al. (1997, April). " Crystal structure of a mixture of lupeol-acetate tautomers isolated from *Hieracium plumulosum* A. Kerner, Asteraceae. " *Journal of Molecular Structure*. 43(5) : 169-179.
- Baron, E. J., Peterson, L. R., and Finegold, S. M.(1994). In *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*(9 th ed.)(p.168).Saint Louis: Mosby.
- Brum, L. R. et al. (1998, December). " Acyl Lupeols from *Cnidioscolus vitifolius*. " *Phytochemistry*. 49(4) 1127-1128.
- Byla, B. & Herz, W. (1996, October). " Triterpenes and 1-(ω -Hydroxyceraty)Glycerols from *Pentaclethra eetveldeana* root bark. " *Phytochemistry*. 42(2) : 501-504.
- Chang, C.I. & Kuo, Y.H. (1999, May). " Two New Lupane-Type Triterpenes from *Diospyros maritima*. " *J.Nat.Prod.* 62 : 309-310.
- Costa, M.A.C. et al. (1998, November). " Naphthoquinones of *Diospyros Chamaethamnus*." *Planta Med.* 64 : 391.
- Gondo, M. et al. (1999, September). " A naphthalene glycoside from callus cultures of *Diospyros Kaki*. " *Phytochemistry*.
- Higa, M., Ogihara, K. & Yogi, S (1998, April). " Bioactive Naphthoquinone Derivatives from *Diospyros maritima* BLUME. " *Chem. Pharm. Bull.* 46(8) : 1189-1193.
- Hiroya, K., et al. (2002, May). " Synthesis of Betulin Derivatives and Their Protective Effects against the Cytotoxicity of Cadmium " *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10 : 3229-3236.

- Hisham, A., et al. (1995, March). " Salacianone and Salacianol, Two triterpenes from *Salacia Beddomei*. " *Phytochemistry*. 40(4) : 1227-1231.
- Jain, N. & Yodava, R. (1994, July). " Peregrinol, A Lupane type triterpene from the fruits of *Diospyros peregrina*. " *Phytochemistry*. 35(4) : 1070-1072
- Khan, M.R. & Rwekika, E. (1998, March). " A Binaphthoquinone from *Diospyros greeniwayi*. " *Phytochemistry*. 49(8) : 2501-2503.
- Khan, M.R. & Rwekika, E. (1999, June). " 6', 8'-Bisdiosquinone from *Diospyros mafiensis*. " *Photochemistry*. 50 : 143-146.
- Kuo & Chang (2000, March). : " Six new compounds from the Heartwood of *Diospyros maritima*. " *Chem. Pharm. Bull.* 48(8) : 1211-1214.
- Kuo, Chang & Kuo (1997, January). : " Triterpenes from *Diospyros maritima*. " *Phytochemistry*. 46(6) 1135-1137
- Kuo, Y.H. et al.(1997, November). " Cytotoxic Constituents from the Stems of *Diospyros maritima*. " *Planta. Med.* 63 : 363-365.
- Lajubutu, B.A. (1994, February). " Antibacterial Activity of Diosquinone Isolated from *Diospyros tricolor*. " *Planta. Med.* 60 : 477
- Lajubuta, B.A. et al. (1995, March). " Antibacterial Activity of Diosquinone and Plumbagin from Root of *Diospyros mespiliformis*(Hostch) (Ebenaceae) ." *Phytotherapy Research*. 9 : 346-350.
- Lambors C, Vanderberg JP. (1979, June). " Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. " *J. Parasitol.* 65(3) : 418-20
- Li, X.C., Bijl. P.v.d. & Wu, C.D. (1998, November). "Binaphthalenone Glycosides from African Chewing Sticks , *Diospyros lycioides*. " *J. Nat. Prod.* 61 : 817-820.
- Likhitwitayawuid, K. et al.(1999, May). "Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. " *Planta. Med.* 65 : 754-756
- Mahato, S. B. & Kundu.A. P. (1994, May). " ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. " *Phytochemistry*. 37(6) : 1517-1575.
- Mallavadhani, U.V. , Panda, A.K. & Rao, Y.R. (1998, October). " Pharmacology and Chemotaxonomy of *Diospyros*. " *Phytochemistry* . 49(4) : 901-951.

- Misra, G. & Mitra, C.R. (1968, October). " Constituents of leaves, heartwood and root of *Minousops elengi* " *Phytochemistry* . 7 : 501-502.
- Monaco, P & Previtera, L. (1984, August) " Isopenoids from the leaves of *Quercus suber* " *J. Nat. Prod.* 47(4) : 673-676.
- Paknikar, S.K. et al. (1996, June). " 4-Hydroxy-5-methylcoumarin Derivatives from *Diospyros kaki* Thunb and *D. kaki* var. *sylvestris* Makino ; Structure and Synthesis of 11-Methylgerberinol. " *Phytochemistry*. 41(3) : 931-933.
- Recio, et al. (1995, April) "Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*." *Planta. Med.* 61 : 9-12.
- Sakakibara, J. et al. (1983, July). " 6 β -hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus* " *Phytochemistry*. 22(11) : 2533-2555.
- Sookkua, P. (2002). *Chemical Constituents of Crataeva nurvala Ham. Stem bark*. Master Thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School Srinakharinwirot University. Photocoppied.
- Sumanasrithakul, C. (1972). *The Chemical Constituents of the Bark of capparidaceae Crataeva erythrocarpa*. Master Thesis, M.S. (Organic Chemistry). Bangkok : Graduate School Mahidol University. Photocoppied.
- Sutthivaiyakit, S. et al. (1995, December). " Constituents of *Diospyros rhodocalyx*. " *Planta. Med.* 61 : 295
- Tengchaisri, T. et al (1998, July). " Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth in vitro and in hamsters " *Cancer Letters*. 133 : 169-175
- Tinto, W. F. et al. (1992, March). " Lupane Trierpenoids of *Salacia cordata* " *J.Nat.Prod.* 55(3) : 395-398.
- Trongsakul, S. et al. (2003, December). " The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. " *J. Ethnopharmacology*. 85 : 221-225.
- Yoshihira, K. et al. (1971, June). " Naphthoquinone Derivatives from the Ebenaceae. I. Diospyrol and the Related Naphthoquinones from *Diospyros mollis* Griff. " *Chem. Pharm. Bull.* 19(11) : 2271-2277

Youkwan, J. (2002). *Chemical Constituents and some bioactive of the leaves of Phyllanthus polyphyllus wild. var. siamnsis airy shaw* Master thesis, M.S. (Applied Chemistry). Bangkok : Graduate School Ramkhamheang University. Photocopied.

ภาคผนวก

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

การเลี้ยงเซลล์

ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (หมู่ O) infected ด้วยเชื้อ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ 94 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา 94 chloroquine (chloroquine sensitive) ที่เลี้ยงด้วยวิธีของ Trager และ Jensen (1976) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ RPMI 1640 (Gibco, USA) ซึ่งเติม 25 mM HEPES (Sigma, USA) 40 mg/mL gentamicin sulfate (Government Pharmaceutical Organization, Thailand) และ 10% serum โดยก่อนการทดสอบต้องเตรียมเชื้อให้อยู่ในรูป ring form อย่างเดียว โดยใช้ sorbital hemolysis (Lambors C, Vanderberg JP. 1979 : 418-20) นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมสี Geimsa เพื่อหาจำนวน % Parasitemia

การทดสอบฤทธิ์

นำเซลล์ suspension ที่อยู่ในรูป ring form (0.5-1 %) เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 15% serum เพื่อให้มีจำนวนเซลล์เป็น 10% cell suspension จากนั้นนำ cell suspension ที่ได้ไปเติมลงใน microtiter plate ชนิด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมให้มีปริมาตร 50 μ l แล้วเติมน้ำละลายยาที่ต้องการทดสอบอีก 50 μ l แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศ 5% CO₂ 94% N₂ และ 1% O₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ % Parasitemia โดยการ fixed-methanol แล้วย้อมด้วยสี Geimsa แล้วนำมาคำนวณหาค่า IC₅₀

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic assay)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบมีสองชนิด คือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) และเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เป็นเซลล์มะเร็งของคน ซึ่งมีการเจริญเติบโตเป็นแบบ monolayer ในการทำ cytotoxic assay จะทำการทดสอบใน 96-well plate โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เป็นจำนวน 3×10^5 cells/mL หรือใช้เซลล์เป็นจำนวน 3×10^4 เซลล์ใน 100 μ l ต่อหลุม เซลล์จะถูกนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดสอบ การเตรียมสาร จะละลายสารใน น้ำ หรือ DMSO หลังจากนั้นจึงนำมาละลายต่อใน Media หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 100 μ g/mL และ ทำการ dilute สารด้วย dilution 1:10 และ 1:2 ใน media นำสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วยปริมาตร 100 μ l ใส่ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้น incubate plate ต่ออีก 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละ plate มาล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) 3 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ตายออก จึงทำการย้อมเซลล์ที่เหลืออยู่ ด้วยสี crystal violet และใช้ 100 μ l ของ 100 mM HCl ใน absolute methanol ละลายสี crystal violet นำไปวัด

OD (optical density) โดยใช้เครื่อง microplate reader (Titertek, Multiskan MCC/340) ซึ่งวัดที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปคำนวณหาค่า ED_{50} (ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้ร้อยละ 50)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ทำการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยมหิดล)

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวิธี agar dilution (Baron, E. J., Peterson, L. R., and Finegold, S. M. 1994 : 168) โดยนำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงใน tryptic soy broth ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard เบอร์ 1 แล้ว inoculate ลงใน Müller-Hinton plate ที่มีความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบตามที่ปรับไว้ (ในช่วงความเข้มข้น 2-256 $\mu\text{g/mL}$) โดยใช้ automatic multipoint inoculator นำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเทียบกับ control Müller-Hinton plate ที่เตรียมโดยวิธีเดียวกันแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ โดยเกรดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน control plate เป็น 4 แล้วลดลงตามปริมาณเชื้อที่ขึ้นในแต่ละ plate เป็น 3 2 1 และ 0 (เมื่อไม่เห็นเชื้อขึ้น) ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียพบว่า สารสกัด dichloromethane และ สารสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียอยู่ในระดับที่ดีคือมี $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัด hexane และสารสกัด methanol มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียอยู่ในระดับปานกลางคือมี $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และเซลล์มะเร็งในช่องปาก พบว่า ทุกสารสกัด ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และเซลล์มะเร็งในช่องปาก

3. . ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ได้นำผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เสนอต่อที่ประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วทท.) ครั้งที่ 29 วันที่ 20-22 ตุลาคม 2546 ณ ศูนย์ประชุมอเนกประสงค์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยขอนแก่น



บทคัดย่อ ABSTRACTS

การประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29

20-22 ตุลาคม 2546

ณ ศูนย์ประชุมอเนกประสงค์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยขอนแก่น

29th Congress on Science and Technology of Thailand

20-22 October 2003

Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean University



กระทรวงศึกษาธิการ
THE MINISTRY OF EDUCATION AND SPORTS
12, 14, 16, 18, 20, 22



คณะวิทยาศาสตร์
FACULTY OF SCIENCE
Srinakharinwirot University

SC-155P: Isolation and Bioactive Agents from *Diospyros rubra* Lec.

Punirai Saraban¹, Supaluk Prachayasittikul¹, Rungrot Cherdurakulkiat², Virapong Prachayasittikul² and Somsak Ruchirawat³

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand;

²Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok-noi, Bangkok 10700, Thailand;

³Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Vipavadee Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

Abstract: *Diospyros rubra* Lec., a Thai medicinal plant belonging to family Ebenaceae, has been used as indigenous medicine for antimicrobial, antituberculosis, diuretic and analgesic actions¹. To date chemical constituents of the *Diospyros rubra* Lec. have not yet been reported. Our first investigation on its crude dichloromethane extracts of the stem of *Diospyros rubra* Lec. led to the isolation of five compounds. There are lupeol derivative 1, lupeol 2, a mixture of stigmasterol and β -sitosterol 3, long chain fatty acid ester 4, and betulin 5. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic methods. Antimicrobial activity of the isolated compounds and fractions was studied by agar dilution method against 33 strains of microorganisms. The results showed that the betulin completely inhibited the growth of *S. pyogenes* at 85 μ g/mL. Six semi-purified fractions (F5, F42, F44, F45, F431 and F432) completely inhibited the growth of *B. catarrhalis* at 64-270 μ g/mL. While the F44 also exhibited very strong antigrowth activity against *S. pyogenes* and *B. cereus* at 256 μ g/mL, partial inhibition to *C. diphtheriae* NCTC 10356 and *N. mucosa* was also detected at the same concentration. In addition, the F2 and F5 showed antigrowth activity to *C. diphtheriae* NCTC 10356 at 256 μ g/mL. Besides completely inhibition of *B. catarrhalis*, the F42 showed partial inhibition to *C. diphtheriae* NCTC 10356 at 270 μ g/mL as well.

การแยกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นพญารากดำ

Isolation and Bioactive Agents from *Diospyros rubra* Lec.

พุดิรัตน์ สารบรรณ¹, สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล¹, รุ่งโรจน์ เจริญตระกูลเกียรติ²,
วิระพงษ์ ปรัชชญาสิทธิกุล² และ สมศักดิ์ รุจิรวรรณ³
Puttirat Saraban¹, Supaluk Prachayasittikul¹, Rungrot Cherdtrakulkiat²,
Virapong Prachayasittikul² and Somsak Ruchirawat³

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

²Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

³Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

บทคัดย่อ: *Diospyros rubra* Lec. เป็นสมุนไพรไทย วงศ์ Ebenaceae มีสรรพคุณด้านจุลชีพ รักษา วัณโรค ขับปัสสาวะและระงับปวด ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาทางเคมีของสมุนไพรดังกล่าว การศึกษาครั้งแรกนี้สามารถแยกสารได้ 5 ชนิด ได้แก่ อนุพันธ์ lupeol (1) lupeol (2) สารผสมของ stigmasterol และ β -sitosterol (3) long chain fatty acid ester (4) และ betulin (5) โครงสร้างของสาร เหล่านี้ได้ศึกษาโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้นำสารบริสุทธิ์ 1-5 และสารส่วนต่างๆที่แยกได้มาศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพ 33 ชนิดโดยวิธี agar dilution พบว่าสาร betulin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ *S. pyogenes* ได้อย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้น 85 $\mu\text{g/mL}$ สารที่แยกได้ 6 ส่วน (F5, F42, F44, F45, F431 และ F432) ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *B. catarrhalis* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 64-270 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้สาร F44 ยังออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. pyogenes* และ *B.cereus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 256 $\mu\text{g/mL}$ และยับยั้งเชื้อ *C. diphtheriae* NCTC 10356 และ *N. mucosa* ได้อย่างไม่สมบูรณ์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และพบว่าสาร F2 และ F5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อ *C. diphtheriae* NCTC 10356 ได้ที่ความเข้มข้น 256 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับสาร F42 นั้นนอกจาก ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. catarrhalis* แล้วยังสามารถยับยั้งเชื้อ *C. diphtheriae* NCTC 10356 ได้ไม่สมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 270 $\mu\text{g/mL}$

คำสำคัญ : *Diospyros rubra* Lec., Bioactive agent และ Antimicrobial activity

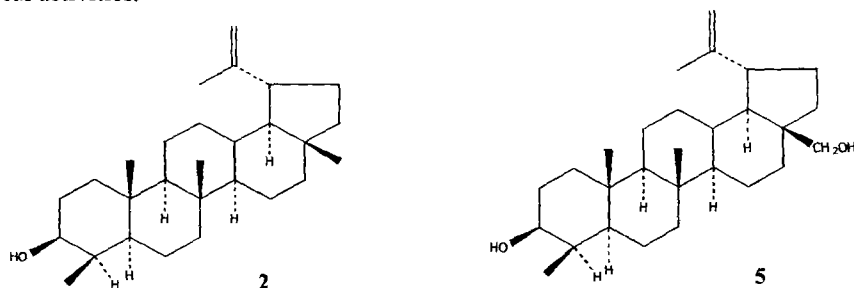
Abstract: *Diospyros rubra* Lec., a Thai medicinal plant belonging to family Ebenaceae, has been used as indigenous medicine for antimicrobial, antituberculosis, diuretic and analgesic actions¹. To date chemical constituents of the *Diospyros rubra* Lec. have not yet been reported. Our first investigation on its crude dichloromethane extracts of the stem of *Diospyros rubra* Lec. led to the isolation of five compounds. There are lupeol derivative 1, lupeol 2, a mixture of stigmasterol and β -sitosterol 3, long chain fatty acid ester 4, and betulin 5. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic methods. Antimicrobial activity of the isolated compounds and fractions was studied by agar dilution method against 33 strains of microorganisms. The results showed that the betulin completely inhibited the growth of *S. pyogenes* at 85 $\mu\text{g/mL}$. Six semi-purified fractions (F5, F42, F44, F45, F431 and F432) completely inhibited the growth of *B. catarrhalis* at 64-270 $\mu\text{g/mL}$. While the F44 also exhibited very strong antigrowth activity against *S. pyogenes* and *B.cereus* at 256 $\mu\text{g/mL}$, partial inhibition to *C. diphtheriae* NCTC 10356 and *N. mucosa* was also detected at the same concentration. In addition, the F2 and F5 showed antigrowth activity to *C. diphtheriae* NCTC 10356 at 256 $\mu\text{g/mL}$. Besides completely inhibition of *B. catarrhalis*, the F42 showed partial inhibition to *C. diphtheriae* NCTC 10356 at 270 $\mu\text{g/mL}$ as well.

Key words : *Diospyros rubra* Lec., Bioactive agent and Antimicrobial activity

Methodology: The crude dichloromethane extract (17 g) of *Diospyros rubra* Lec. was chromatographed on silica gel column, five fractions (F1-F5) were obtained by eluting with hexane and increasing polarity with dichloromethane then ethyl acetate. Fraction F2 (1 g) was subjected to

silica gel column and eluted with hexane:CH₂Cl₂ to give compound 1 (12 mg). Fraction F3 was recrystallized in hexane to give compound 2 (1.3 g). Fraction F4 (4 g) was rechromatographed on silica gel column using gradient elution of dichloromethane and ethyl acetate to afford five fractions (F41-F45) and fraction F41 was compound 2. Fraction F42 was rechromatographed on silica gel column (hexane: CH₂Cl₂) to give compound 3. Fraction F43 was further isolated by silica gel column to provide five fractions of F431-F435, in which F432 was compound 4. Further rechromatography of F433 afforded two fractions of F4331 and F4332 which was pure compound 5. Antimicrobial assay (agar dilution method) of compounds were tested² againsts thirty-three strains of microorganisms.

Results, Discussion and Conclusion: The crude dichloromethane extracts of the stem of *Diospyros rubra* Lec. was isolated and purified by repeated silica gel column and recrystallization to afford five compounds, lupeol derivative 1, lupeol 2, a mixture of stigmasterol and β -sitosterol 3, long chain fatty acid ester 4, and betulin 5 including a mixture of triterpenes and steroids. Antimicrobial activity of the isolated compounds and fractions was investigated by agar dilution method against 33 strains of microorganisms. The results showed that the betulin completely inhibited the growth of *S. pyogenes* at 85 μ g/mL. Six semi-purified fractions(F5, F42, F44, F45, F431 and F432) completely inhibited the growth of *B. catarrhalis* at 64-270 μ g/mL. While the F44 also exhibited very strong antigrowth activity against *S. pyogenes* and *B.cereus* at 256 μ g/mL, partial inhibition to *C. diphtheriae* NCTC 10356 and *N. mucosa* was also detected at the same concentration. Moreover, the F2 and F5 exhibited activity against *C. diphtheriae* NCTC 10356 at 256 μ g/mL Besides completely inhibition of *B. catarrhalis*, the F42 showed partial inhibition to *C. diphtheriae* NCTC 10356 at concentration 270 μ g/mL as well. Our first study have revealed some bioactive compounds existing in the stem of *Diospyros rubra* Lec.. The betulin we isolate herein has never been found possesses antimicrobial activity, however, it has been reported to be antiinflammatory *via* edema test³. Therefore, the lupeol derivative 1, lupeol 2, a mixture of stigmasterol and β -sitosterol 3 and long chain fatty acid ester 4 which show inactive for antimicrobial activity are going to be tested for antiinflammatory and other biological activities.



Acknowledgements

The grant from Thailand Research Fund (TRF) for Professor Somsak Ruchirawat is gratefully acknowledged. We would like to thank the Faculty of Science, Srinakharinwirot University and the Faculty of Medical Technology, Mahidol University for the support and facilities. Thanks are also extended to the Loan Project office, Commission on Higher Education for supporting the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometer.

References

1. นันทวัน บุญประภัสร์ และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2541). สมุนไพรพื้นบ้าน(3). กรุงเทพฯ : ประชาชน
2. Baron, E. J., Peterson, L. R., and Finegold, S. M.(1994). In *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*(9 th ed.)(p.168).Saint Louis: Mosby.
3. Recio, M.C., Giner, R.M., Manez, S., Gueho, J., Julien, H.R., Hostettmann, K., and Rios, J.L. (1995). Investigation on the steroidal Antiinflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*, *Planta Med* 61 : 9-12.

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

br s	broad singlet
BuOH	butanol
$^{\circ}\text{C}$	degree celcius
CC	column chromatography
CDCl_3	deuteriochloroform
CHCl_3	chloroform
cm^{-1}	reciprocal centimetre
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnatic Resonance
d	doublet
dd	doublet of doublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EIMS	Electron Impact Mass Spectrum
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FT IR	Fourier Transform Infared
g	gram
^1H - ^1H COSY	H-relayed correlated spectra
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Conectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
^1H NMR	Proton Nuclear Magnatic Resonance
J	coupling constant
L	litre
m	multiplet
M^+	molecular ion
Me	methyl group
MeOH	methanol
mL	mililitre
MHz	megahertz

m/z	mass to charge ratio
ppm	part per million
prep. TLC	preparative Thin-Layer-Chromatography
s	singlet
t	triplet
TLC	Thin-Layer-Chromatography
UV	ultraviolet
μg	microgram
ν_{max}	maximum absorption frequencies

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวพุดรีดน์ สารบรรณ
วันเดือนปีเกิด	1 กุมภาพันธ์ 2521
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	40/3646 ซอย 25/5 หมู่บ้านประชาณีเวศน์ 3 ถนนติวานนท์ ตำบล ท่าทราย อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย (แผนกวิทย์-คณิต) โรงเรียนเบ็ญจะมะมหาราช จังหวัดอุบลราชธานี
พ.ศ. 2543	วท.บ. (เคมี) สถาบันราชภัฏอุบลราชธานี
พ.ศ.2547	วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร