

องค์ประกอบทางเคมีของแก่นต้นสลัดได *Euphorbia antiquorum* Linn.
ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง



นางสาว รัชฎาภรณ์ กัลปนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

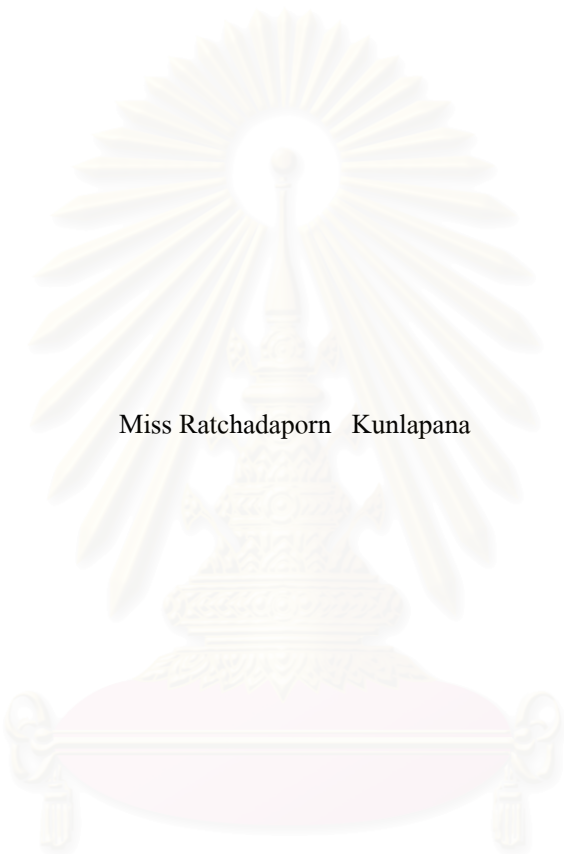
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0316-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Euphorbia antiquorum* Linn. CORE
HAVING CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL LINES



Miss Ratchadaporn Kunlapana

สภามหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0316-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	องค์ประกอบทางเคมีของแก่นต้นสลัดได <i>Euphorbia antiquorum</i> Linn. ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
โดย	นางสาว รัชฎาภรณ์ กัลปนา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ การเที่ยง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการสอบ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย)

รัฐฉกรรณ กัลดปนา : องคัปรระกอบทางเคมึของแก่นต้นสลัดไค *Euphorbia antiquorum* Linn.
ที่เป็นพึชต่อเชลล์มะเร้ง (CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Euphorbia antiquorum* Linn.
CORE HAVING CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL LINES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.
ดร. โสภณ เร้งสำราญ, อ.ที่ปรึกร่วม : รศ.ดร. อมร เพชรสม 106 หน้า ISBN 974-17-
0316-3

ได้ทำการสกัดแยกสารบรึสุทธีจากแก่นของต้นสลัดไค (*Euphorbia antiquorum* Linn.) ที่
แห้งและบดละเอียด ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลแอลกอฮอล์ ทำการแยกสารบรึสุทธีด้วยวึชคอดัมนั
โครมาโตกราฟฟีบนซิลิกาเจลได้สารบรึสุทธี 6 ชนิด และหาสูตรโครงสร้างของสารเหล่านี้โดยอาศัย
สมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบไดเทอร์ปีน 5 ชนิด ได้แก่ ent-Atis-16-ene-3,14-
diene หรือ Deoxyantiquorin (1), ent-(13S)-Hydroxyatis-16-ene-3,14-dione หรือ Antiquorin (2), ent-
8 α ,14 α -Epoxyabieta-11,13(15)-diene-16,12-olide หรือ Jolkinolide A (3), ent-16 α ,17-Dihydroxy-
atisan-3-one (4) และ ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene (6) และสารบรึสุทธีอื่ก 1 ชนิดซึ่งยังไม่
สามารถบอกสูตรโครงสร้างได้ มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปเข็ม จุดหลอมเหลว 197-199 °C (5) และเป็น
ครั้งแรกที่พบสาร 1, 3, 4, 5 และ 6 ในแก่นของต้นสลัดไค นำสารบรึสุทธีที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการ
ยับยั้งการเจริญของเชลล์มะเร้ง 5 ชนิด ได้แก่ Hep-G2(ตับ), Sw620(ลำไส้), Chago(ปอด), Kato-3
(กระเพาะอาหาร) และ BT474(เต้านม) พบว่า Jolkinolide A (3) และสาร 5 ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่แสดง
ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชลล์มะเร้งได้ดีทั้ง 5 ชนิด ent-Atis-16-ene-3,14-diene (1) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง
เชลล์มะเร้งกระเพาะอาหารได้ดี และ ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene (6) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง
เชลล์มะเร้งลำไส้ และเชลล์มะเร้งกระเพาะอาหารได้ในระดับปานกลาง และเป็นครั้งแรกในการรายงาน
ผลการทดสอบการยับยั้งเชลล์มะเร้งของสารทั้ง 6 ชนิด

หลักสูตร เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิติ
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกร่วม

C4272377823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : CHEMICAL CONSTITUENT / *Euphorbia antiquorum* Linn. / CYTOTOXICITY

RATCHADAPORN KUNLAPANA : CHEMICAL CONSTITUENTS OF
Euphorbia antiquorum Linn. CORE HAVING CYTOTOXICITY AGAINST
CANCER CELL LINES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOPHON
ROENGSUMRAN, Ph.D., THESIS Co-ADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN
PETSOM, Ph.D. 106 pp. ISBN 974-17-0316-3

The chemical constituents of finely crushed air-dried core of *Euphorbia antiquorum* Linn. in hexane crude extract and ethyl acetate crude extract were separated by column chromatography on silica gel. Structure elucidation of the isolated compounds were investigated using physical properties and spectroscopic techniques. Six compounds were isolated and identified. There were five diterpene compounds namely, ent-Atis-16-ene-3,14-diene or Deoxyantiquorin (1), ent-(13S)-Hydroxyatis-16-ene-3,14-dione or Antiquorin (2), ent-8 α ,14 α -Epoxyabieta-11,13(15)-diene-16,12-olide or Jolkinolide A (3), ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one (4) and ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene (6) . The structure of compound (5) which was needle crystals (mp. 197-199 $^{\circ}$ C) was still under investigation. Moreover, this is the first report of compound 1, 3, 4, 5 and 6 from this plant. All compounds were tested for cytotoxicity against cancer cell lines : HS27 (fibroblast), Hep-G2 (hepatoma), SW620 (colon), Chago (lung), Kato-3 (gastric) and BT474 (breast). Jolkinolide A (3) and compound 5 showed significant cytotoxicity against all cancer cell lines. Ent-Atis-16-ene-3,14-diene (1) showed high cytotoxicity against Kato-3 (gastric) and ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene (6) exhibited moderate cytotoxicity against SW620 (colon) and Kato-3 (gastric). Moreover, this is the first report of cytotoxicity test of 6 compounds from *Euphorbia antiquorum* Linn.

Program Biotechnology Student's signature _____

Field of student Biotechnology Advisor's signature _____

Academic year 2001 Co-advisor's signature _____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมคือ รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ และรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีซึ่งตลอดเวลาที่ทำการวิจัย ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จโดยสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุรัชย์ พรพุกกุล และอาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวิชัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นงนุช ใจบุญ และ อาจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยชิต ในการวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่มีลักษณะเป็นผลึก

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ พู่ทอง สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต่อเซลล์มะเร็ง

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ ทุนทรัพย์และความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ตลอดจนขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาตลอดเวลาที่ทำการศึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญแผนภาพ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อที่ใช้ทั่วไป.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
3. การทดลองและผลการทดลอง.....	24
3.1 พีชตัวอย่าง.....	24
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร.....	24
3.3 สารเคมี.....	25
3.4 วิธีการสกัด.....	26
3.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดจากแก่นสลัดได.....	27
3.5.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	27
3.5.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตตโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	27
3.5.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอลโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	27
3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง.....	28
4. ผลการทดลอง.....	31
4.1 ผลการศึกษาสิ่งสกัดที่สกัดได้จากแก่นสลัดได.....	31
4.2 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดจากแก่นสลัดได.....	31
4.2.1 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	31
4.2.2 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตตโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.3 ผลการทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	35
4.3.1 ผลการทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	35
4.3.2 ผลการทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	36
4.3.3 ผลการทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	37
4.3.4 ผลการทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	39
4.3.5 ผลการทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	40
4.3.6 ผลการทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้างของสาร.....	41
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็ง.....	42
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	44
5.1 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสารที่แยกได้ในสิ่งสกัดเฮกเซนและ เอทิลแอลกอฮอล์จากแก่นสลัดได.....	44
5.1.1 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสาร 1.....	44
5.1.2 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสาร 2.....	48
5.1.3 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสาร 3.....	59
5.1.4 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสาร 4.....	63
5.1.5 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสาร 5.....	67
5.1.6 ผลการวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสาร 6.....	71
6. สรุปผลการทดลอง.....	75
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	106

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
1. ขั้นตอนการสกัดสารจากแก่นสลัดได.....	26
2. วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็ง.....	30
3. สารที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน.....	32
4. สารที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตต.....	34
5. สารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของแก่นสลัดไดซึ่งแยกได้โดยใช้ ตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลเอซิเตต.....	76



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชในวงศ์ Euphorbiaceae.....	3
2. พืชในวงศ์ Euphorbiaceae และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	8
3. ผลของสิ่งสกัดที่สกัดได้จากแก่นสลัดได.....	31
4. ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	32
5. ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอลกอฮอล์ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	33
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิดของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	42
7. ค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด.....	43
8. แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1.....	44
9. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับสาร ent-Atis-16-ene-3, 14-dione.....	46
10. คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับสาร ent-Atis-16-ene-3, 14-dione.....	46
11. แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2.....	47
12. ข้อมูลโครงสร้างผลึกของสาร 2.....	50
13. Atomic Coordinates ($\times 10^4$) และ equivalent isotropic displacement parameters ($A^2 \times 10^3$) ของสาร 2.....	51
14. ความยาวพันธะ (Bond length; Å) และมุม (Angle; deg) ของสาร 2.....	52
15. Anisotropic displacement parameters ($A^2 \times 10^3$) ของสาร 2.....	54
16. Hydrogen bond ของสาร 2.....	54
17. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 เปรียบเทียบกับสาร Antiquorin.....	56
18. คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 เปรียบเทียบกับสาร Antiquorin.....	58
19. แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3.....	59
20. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 เปรียบเทียบกับสาร Jolkinolide A.....	61
21. คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 เปรียบเทียบกับสาร Jolkinolide A.....	62
22. แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4.....	63

สารบัญตาราง(ต่อ)

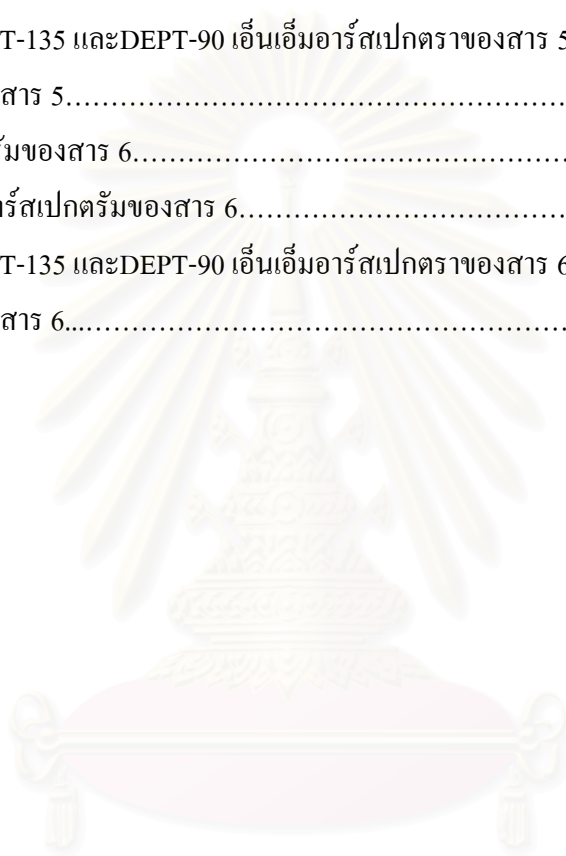
ตารางที่	หน้า
23. โพรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 เปรียบเทียบกับสาร ent-16 α , 17-Dihydroxyatisan-3-one.....	65
24. คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 เปรียบเทียบกับสาร ent-16 α , 17-Dihydroxyatisan-3-one.....	66
25. แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5.....	67
26. โพรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 เปรียบเทียบกับสาร ent-16 α , 17-Dihydroxyatisan-3-one.....	69
27. คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 เปรียบเทียบกับสาร ent-atisane-3 β , 16 α ,17-triol.....	70
28. แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 6.....	71
29. โพรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6 เปรียบเทียบกับสาร ent-13, 3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene.....	73
30. คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6 เปรียบเทียบกับสาร ent-13, 3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene.....	74

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นสกัดได้.....	4
2. โครงสร้างของสาร 1 หรือสาร ent-Atis-16-ene-3,14-diene.....	45
3. โครงสร้างของสาร 2 หรือสาร Antiquorin.....	49
4. ORTEP Drawing ของสาร 2.....	55
5. The packing diagram ของสาร 2.....	55
6. โครงสร้างของสาร 3 หรือสาร Jolkinolide A.....	60
7. โครงสร้างของสาร 4 หรือสาร ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one.....	64
8. โครงสร้างของสาร ent-atisane-3 β ,16 α ,17-triol.....	68
9. โครงสร้างที่คาดว่าจะเป็นของสาร 5.....	68
10. โครงสร้างของสาร 6 หรือสาร ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene	72
11. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1.....	82
12. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1.....	83
13. คาร์บอน-13 , DEPT-135 และDEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตราของสาร 1.....	84
14. แมสสเปกตรัมของสาร 1.....	85
15. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2	86
16. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2.....	87
17. คาร์บอน-13 , DEPT-135 และDEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตราของสาร 2.....	88
18. แมสสเปกตรัมของสาร 2.....	89
19. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3.....	90
20. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3.....	91
21. คาร์บอน-13 , DEPT-135 และDEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตราของสาร 3.....	92
22. แมสสเปกตรัมของสาร 3.....	93
23. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4.....	94
24. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4.....	95
25. คาร์บอน-13 , DEPT-135 และDEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตราของสาร 4.....	96
26. แมสสเปกตรัมของสาร 4.....	97

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
27. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5.....	98
28. โพรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5.....	99
29. คาร์บอน-13 , DEPT-135 และDEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5.....	100
30. แมสสเปกตรัมของสาร 5.....	101
31. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 6.....	102
32. โพรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6.....	103
33. คาร์บอน-13 , DEPT-135 และDEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6.....	104
34. แมสสเปกตรัมของสาร 6.....	105



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อที่ใช้ทั่วไป

DMSO	dimethyl sulfoxide
TMS	tetramethylsilane
Hz	Hertz
ppm	part per million
m/z	mass to charge ratio
ϵ	Extinction Coefficient
Rf	rate of flow in chromatography
br	broad(NMR)
s	singlet (NMR)
d	doublet (NMR)
dd	doublet of doublet(NMR)
ddd	doublet of doublet of doublet(NMR)
dddd	doublet of doublet of doublet of doublet (NMR)
dt	doublet of triplet(NMR)
t	triplet (NMR)
q	quartet (NMR)
m	multiplet (NMR)
s	strong (IR)
m	medium (IR)
w	weak (IR)
b	broad (IR)
λ_{max}	the wavelength at maximum absorption
δ	chemical shift
TLC	thin layer chromatography
$^{\circ}\text{C}$	องศาเซลเซียส

บทที่ 1

บทนำ

ทวีปเอเชียเป็นแหล่งพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งพืชส่วนใหญ่เป็นพืชที่ชนพื้นเมืองนำมาใช้เพื่อรักษาโรคกันมานานนับพันปีแล้ว วิธีการนำสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้ก็เป็นวิธีโบราณที่สืบทอดกันมานานจากรุ่นหนึ่งสู่รุ่นใหม่ โดยไม่มีทั้งการจดบันทึกเป็นลายลักษณ์อักษรและการวิจัยที่ยืนยันถึงความปลอดภัยของสมุนไพรชนิดนั้นๆ ต่างจากประเทศที่พัฒนาแล้วจะนำสมุนไพรมาใช้อย่างมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน โดยมีคณะนักวิจัยทำการสำรวจตั้งแต่ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืช สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืช และการนำพืชมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชศาสตร์และพิษวิทยา รวมทั้งเทคนิคการเพาะปลูกพืชสมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม

ประเทศไทยเป็นแหล่งของสมุนไพรมากมายมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่สมัยโบราณ ในรูปของยาพื้นบ้านและยาแผนโบราณ ซึ่งในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ไทยได้หันมาสนใจศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพร ที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่างๆ อย่างแพร่หลายเพื่อเป็นต้นแบบในการผลิตยาสังเคราะห์ และเพื่อทดแทนสารสังเคราะห์บางชนิดที่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยและเกิดการสะสมในร่างกายเมื่อใช้ยาเป็นระยะเวลานาน

พืชในวงศ์ Euphorbiaceae ที่รู้จักกันดี ได้แก่ สลัดได สลวด พญาไร้ใบและเปล้า ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในยารักษาโรคต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะสลัดไดซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพืชมีพิษ แต่จากการค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า มีการนำส่วนต่างๆ ของต้นสลัดไดมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคที่แตกต่างกัน เช่น น้ำยางจะมีพิษมาก ก่อนนำไปใช้ต้องผ่านการลดความเป็นพิษก่อนโดยการต้มเพิ่มความดัน จึงจะนำไปปรุงเป็นยารักษาโรคได้ นอกจากนี้ในส่วน of ต้นแก่นหรือกระลำพักและค่างที่สกัดได้ยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ แก้กูกเสียด และบำรุงหัวใจ เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากแก่นของต้นสลัดได ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยจากการทดสอบในเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากแก่นสลัดไดมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี และจากการสืบค้นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยังไม่มียางานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นสลัดไดมาก่อน ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาเพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากแก่นสลัดไดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง แล้วทำการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและวิเคราะห์สูตร โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี
- 2.ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

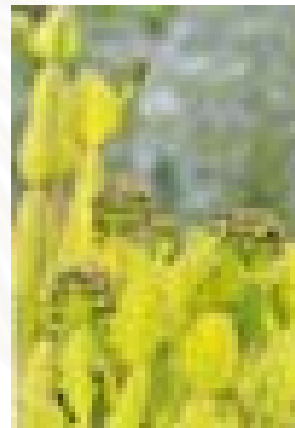
สลัดไดหรือสลัดไดป่ามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Euphorbia antiquorum* Linn. เป็นพืชในวงศ์(family) Euphorbiaceae มีชื่ออังกฤษว่า Malayan Spurge Tree, Milkbush , Triangular Spurge และชื่ออื่นๆที่เรียกตามภูมิภาคได้แก่ กะลำพัก(นครราชสีมา) เคียะผา(เหนือ) หงอนงู(แม่ฮ่องสอน) ทูดุเถละ(กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) หงอนเงือกหรือเล็กเงือก(อีสาน) พบทั่วไปในเขตร้อน ขึ้นตามโขดหิน ป่าเขาและชายทะเล ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและปักชำกิ่ง (1)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชในวงศ์ Euphorbiaceae (Spurge family) เป็นไม้ล้มลุก ไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่มีน้ำยางสีขาว ใบส่วนใหญ่เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ มีหูใบ ดอกช่อแบบต่างๆ ดอกแยกเพศ มีสมมาตรแบบสมมาตร (regular) กลีบเลี้ยง 5 หรือไม่มี กลีบดอกส่วนใหญ่ไม่พบ ดอกตัวผู้มีเกสรตัวผู้ 1 หรือหลายอัน แยกกันหรือเชื่อมติดกัน มักพบรังไข่ที่ฝ่อแล้วหลงเหลืออยู่ ดอกตัวเมียมีเกสรตัวเมีย 1 อัน ประกอบด้วย 3 carpel มี 3 ห้อง แต่ละห้องมี ovule 1-2 อัน ตำแหน่งของรังไข่อยู่เหนือวงกลีบ ผลมีหลายแบบเช่น capsule เมล็ดมี endosperm ขนาดใหญ่ และมี caruncle ชัดเจน ตัวอย่างของพืชในวงศ์นี้ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชในวงศ์ Euphorbiaceae

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
ตำแยแมว	<i>Acalypha indica</i> Linn.
มะกา	<i>Bridelia ovata</i> Decne
เปล้าใหญ่	<i>Croton oblongifolius</i> Roxb.
เปล้าน้อย	<i>Croton sublyratus</i> Kurz
สลอด	<i>Croton tiglium</i> Linn.
สลัดได	<i>Euphorbia antiquorum</i> Linn.
น้านมราชสีห์	<i>Euphorbia hirta</i> Linn.
น้านมราชสีห์เล็ก	<i>Euphorbia thymifolia</i> Linn.
พญาไร้ใบ	<i>Euphorbia tirucalli</i> Linn.
ดาตุ่มทะเล	<i>Excoecaria agallocha</i> Linn.
ยางพารา	<i>Hevea brasiliensis</i> Linn.
โฝฝรั่ง	<i>Hura crepitans</i> Linn.
สบู่ดำ	<i>Jatropha curcas</i> Linn.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแก่นสลัดไดเป็นไม้พุ่มถึงไม้ยืนต้น ลำต้นเป็นสามเหลี่ยมสีเขียวตรง สูงประมาณ 2-5 เมตร ลำต้นมีการแตกออกเป็นสามยอด ลักษณะคล้ายต้นกระบองเพชร เมื่อโตเต็มที่ลำต้นจะแตกกิ่งก้านสาขามากมาย ตรงสั้นของลำต้นมีหนามเป็นกระจุกๆละ 2 เรียงลงมาตลอดลำต้น ภายในลำต้นมีน้ำยางสีขาวเหมือนน้ำมัน เป็นพิษต่อผิวหนัง ใบเป็นใบเดี่ยว ขนาดเล็กรูปช้อนสีเขียว ร่วงเร็วจึงคล้ายไม่มีใบ ดอกจะออกในฤดูหนาว เป็นกลุ่มสีเหลือง 1-3 ดอกสลับกับหนามตรงส่วนปลายกิ่ง ไม่มีกลีบดอก ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่คนละดอกภายในช่อเดียวกัน ผลเป็นสามพู แตกออกได้ ภายในมีเมล็ด ต้นที่มีอายุหลายปีจะมีแก่นแข็งซึ่งเชื่อราตามธรรมชาติเจริญอยู่ได้ ทำให้แก่นนั้นมีกลิ่นหอม เรียกว่า “กระลำพักสลัดได” ใช้เป็นยา (2)



รูปที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสลัดได

สรรพคุณแตกต่างกันตามส่วนต่างๆที่นำมาใช้ได้แก่น้ำยางมีความเป็นพิษสูงและระคายเคืองมาก มีฤทธิ์ทำให้อาเจียน ถ้าถูกผิวหนังจะอักเสบ คัน พองแดงและไหม้ ถ้าเข้าตาอาจบอดได้ ต้องนำมาผ่านการลดพิษก่อนโดยการต้มหรือตุ๋น จนกระทั่งน้ำยางรวมกันเป็นก้อนจึงจะนำมาใช้เป็นยาได้ (3) มีสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนัง ใช้ทาเพื่อรักษาหูด กลากเกลื้อน แก้มัด มีฤทธิ์เป็นยาถ่ายอย่างแรง รักษาโรคริดสีดวงดำไส้ ริดสีดวงทวารหนัก ใช้ปรุงยาถ่ายอุจจาระ ยาทำให้อาเจียน ยาถ่ายน้ำเหลือง ถ่ายเสมหะ และโลหิตเป็นพิษ นอกจากนี้สารฟอรับอล(phorbol) ที่พบในน้ำยางเป็นสารร่วมเร่งทำให้เกิดมะเร็ง(Co-carcinogenic activity) และเป็นตัวช่วยรักษามะเร็งในเม็ดเลือดได้ด้วย สารสำคัญที่พบในน้ำยางนั้นประกอบด้วย caoutchouc 4-7% นอกนั้นเป็นสารประกอบเรซิน(resin) และเทอร์ปีนอยด์(terpenoids)ชนิดต่างๆ ได้แก่

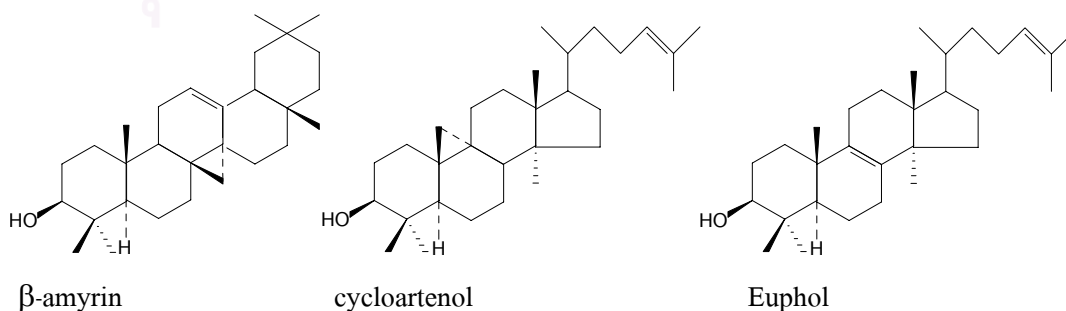
เตตระไซคลิก ไดเทอร์ปีน (tetracyclic diterpene) ได้แก่ ฟอรับอล(phorbol) เช่น 12-deoxyphorbol, 13-tiglate 20-acetate, ingenol และ เอสเทอร์(ester) เช่น 16-hydroxyingenol 3,5,6,20-tetraacetate

ไตรไซคลิก ไดเทอร์ปีน(tricyclic diterpene) ได้แก่ tinyatoxin, huratoxin และสำหรับเรซินพบ เบต้าอะไมริน(β -amyrin), ไซโครอาร์เทนอล(cycloartenol), ยูฟอล(euphol) และ ยูโฟรอล(euphorol) (2)

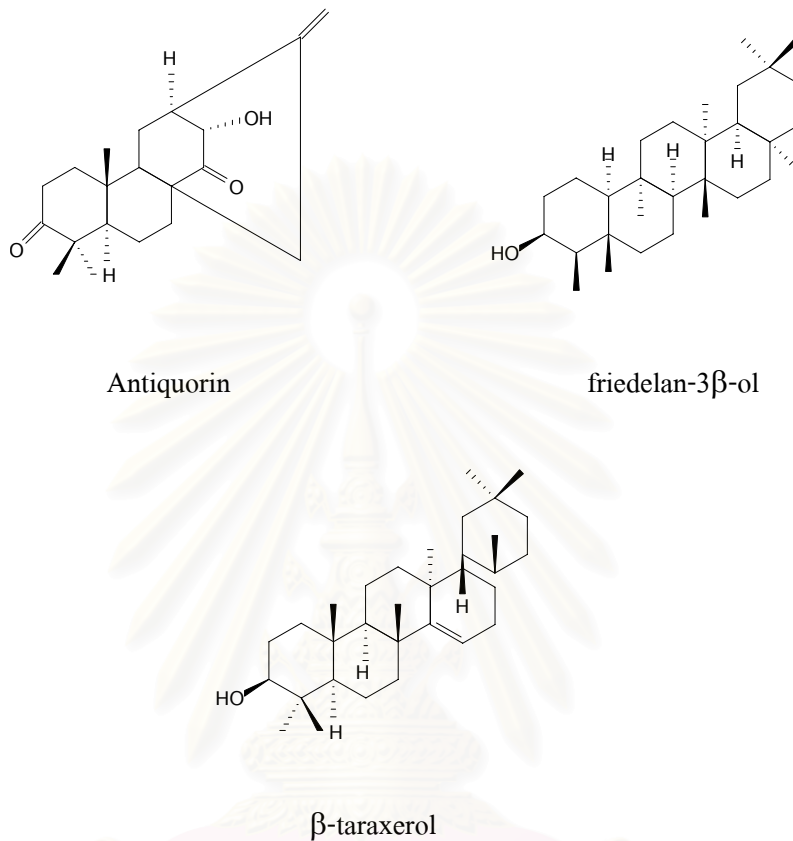
ต้นและเปลือก มีรสเมาเบื่อเอียน นำมาตากแดดให้แห้ง ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิในท้อง พบสารประกอบพวกเทอร์ปีนอยด์, ทาราเซอร์อล(taraxerol) และอีพีฟรีเดแลนอล(epi-friedelanol) นอกจากนี้ต่างจากต้นที่ได้จากการเผาต้นสลดไคแล้วแช่กรองเอาเฉพาะน้ำค้าง มีรสขมเมาเล็กน้อย ใช้ดื่มแก้ฟกบวม จุกเสียด ผอมเหลือง แก้อัมพาต หืดไอ ส่วนกระลำพักหรือแก่นของต้นแก่ มีรสขมกลื่นหอม ใช้แก้ไข้จับลม และบำรุงหัวใจ (1)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นสลดไคได้มีผู้เคยทำการวิจัยไว้แล้วดังนี้ คือ

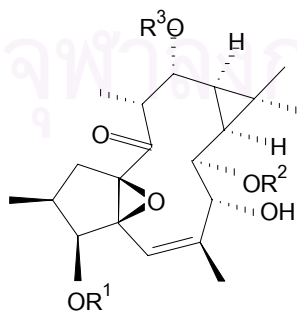
ปี ค.ศ.1971 Anjaneyulu V. และ Ramachandra R.L. (4) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำยางจากต้นสลดไค พบสาร β -amyrin, cycloartenol, euphol และ α -euphorbal และทำการสังเคราะห์ โดยใช้ cycloartenyl acetate เป็นสารตั้งต้น ได้สารประกอบชนิดใหม่ 4 ชนิด คือ parkeol, dibromo acetate, parkeyl acetate และ agnosterol



ปี ค.ศ.1989 Min Zhi-da และคณะ (5) แยกสารประกอบไดเทอร์ปีนชนิดใหม่ได้จากส่วนลำต้นของสัลดัด คือสารแอนติควอริน (antiquorin) และสารประกอบไตรเทอร์ปีน 2 ชนิด คือ friedelan-3 β -ol และ β -taraxerol

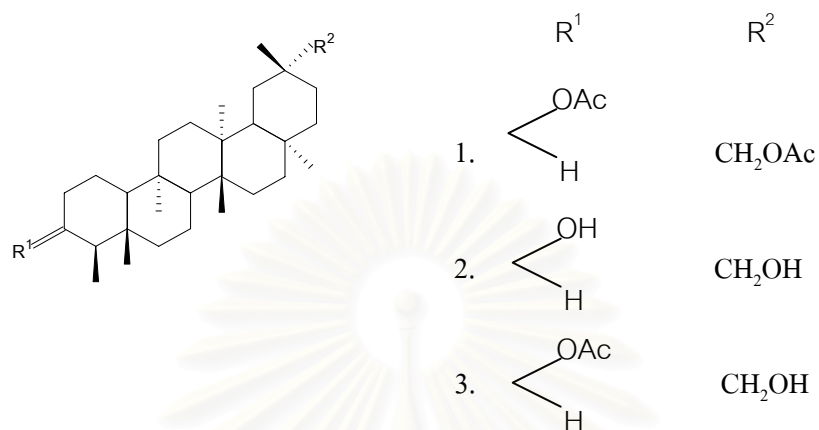


ปี ค.ศ.1989 Mohan B.G. และคณะ (6) แยกสารประกอบไดเทอร์ปีนชนิดใหม่ได้ 4 ชนิด จากยางของต้นสัลดัดได้คือ 3,12-di-O-acetyl-8-O-benzoylongo (1), 3-12-di-O-acetyl-8-O-tigloylingol (2), 12-O-acetyl-8-O-tigloylingol (3) และ 8-O-tigloylingol (4)

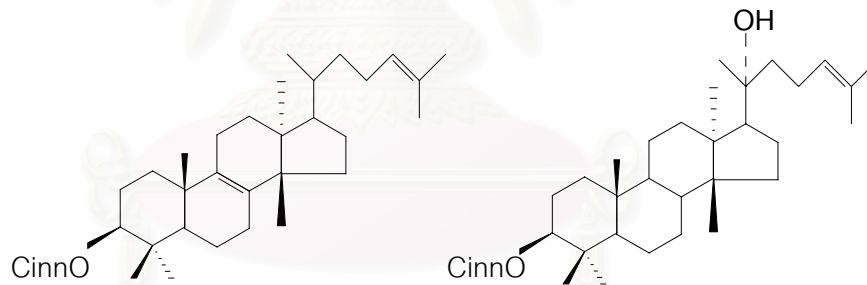


1. $R^1=R^3=Ac, R^2=Bz$
2. $R^1=R^3=Ac, R^2=Tig$
3. $R^1=H, R^2=Tig, R^3=Ac$
4. $R^1=R^3=H, R^2=Tig$

ปี ค.ศ.1989 Anjaneyula V. และ Ravi K. (7) ได้ทำการวิจัยสกัดแยกสารจากส่วนลำต้นของ สลัดได พบสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ friedelane-3 β ,30-diol diacetate (1), 30-acetoxyfriedelan-3 β -ol (2) และ 3 β -acetoxyfriedelan-30-ol (3)

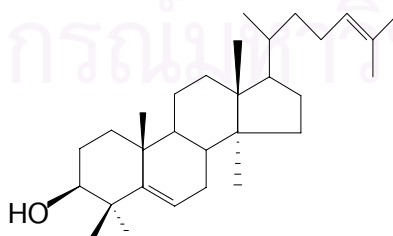


และในปี ค.ศ.1990 Mohan B.G. (8) และคณะ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากยางของต้น สลัดไดพบสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดใหม่ 3 ชนิดคือ euphol-3-O-cinnamate, euphane และ 3-epi-anhydrolitsomentol



euphol-3-O-cinnamate

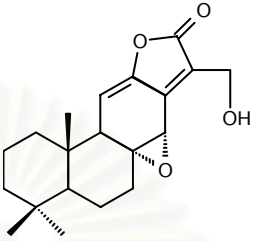
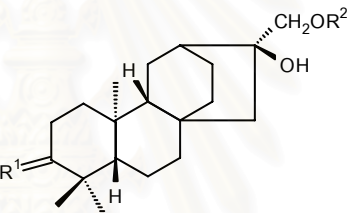
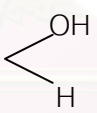
euphane

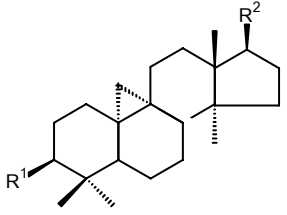
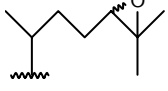
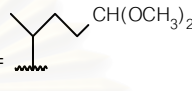
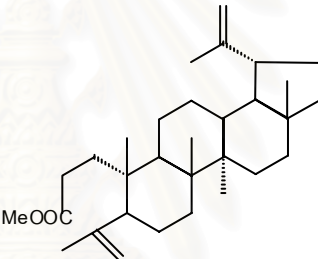
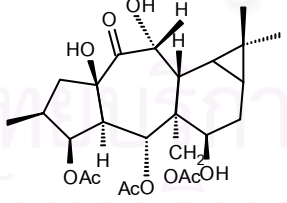


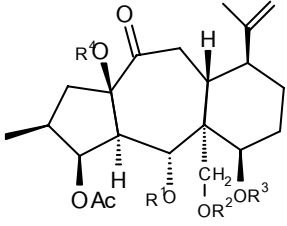
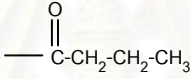
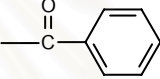
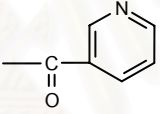
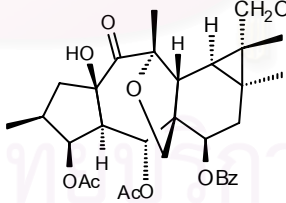
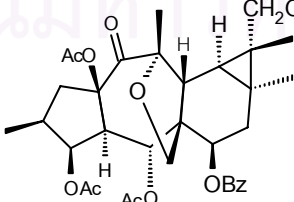
3-epi-anhydrolitsomentol

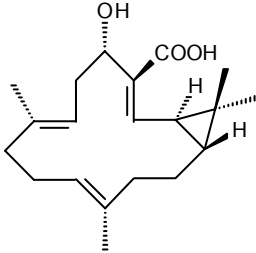
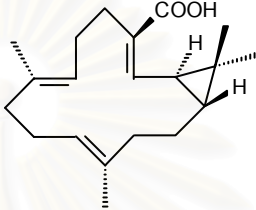
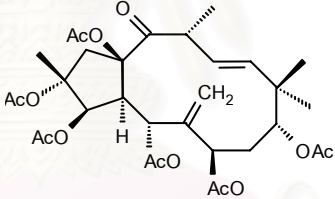
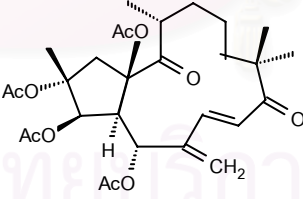
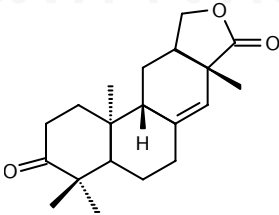
สำหรับผลงานวิจัยของพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มีผู้ทำการศึกษาวิจัยมาแล้วพอสรุปได้
 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ดังนี้

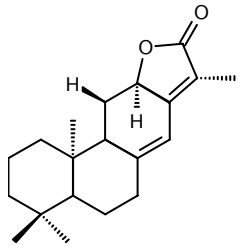
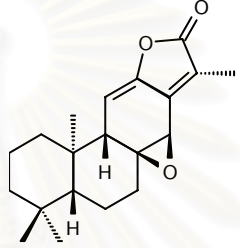
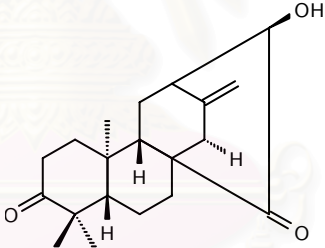
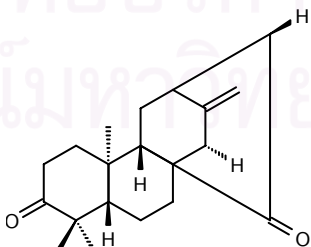
ตารางที่ 2 พืชในวงศ์ Euphorbiaceae และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

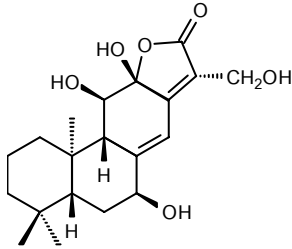
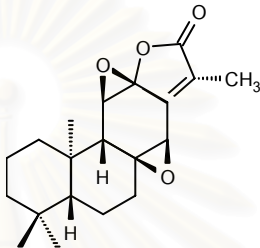
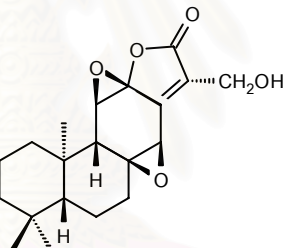
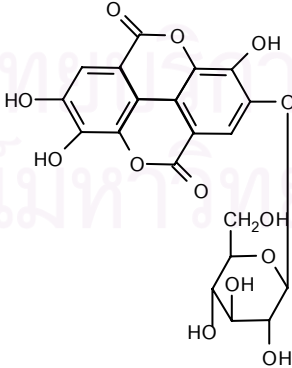
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia acaulis</i>	ไรโซม (Rhizome)	 <p>Caudicifolin (diterpene lactone)</p>  <p>1. $R^1=O, R^2=H$ 3-oxoatisane-16α,17-diol</p> <p>2. $R^1=$  $R^2=H$ ent-atisane-3β,16α,17-triol</p>	9, 10
<i>Euphorbia aleppica</i>	ต้น (Whole plant)	<p>-24-methylenecycloartenol</p> <p>-Cyclolaudenol</p> <p>-Cycloart-25-en-3β-ol-24-one</p> <p>-Cycloart-22-en-3β,25-diol</p> <p>-Cycloart-25-en-3β-ol-24-diol</p> <p>-Scopoletin</p> <p>-Kaemferol</p> <p>-4-hydroxybenzoic acid</p> <p>-Aleppicine A,B (pentacyclic diterpene polyester)</p>	11

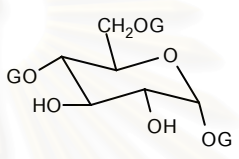
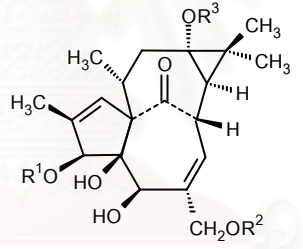
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia broteri</i>	ยาง (Latex)	 <p>1. R¹=OH, R²= </p> <p>24,25-epoxycycloartenol</p> <p>2. R¹=OAc, R²= </p> <p>25,26,27-Trisnor-3β-acetoxy-24-dimethoxycycloartane</p>  <p>3,4-seco-4(23),20(30)-Lupadien-3-methylester</p>	12
<i>Euphorbia boetica</i>	ต้น (whole plant)	 <p>Eufoboetol-3,5,17-triacetate</p> <p>-5α-stigmastane-3β-6α-diol</p> <p>-5α-stigmastane-3β-5,6β-triol</p> <p>-β-sitosterol glucopyranoside</p>	13

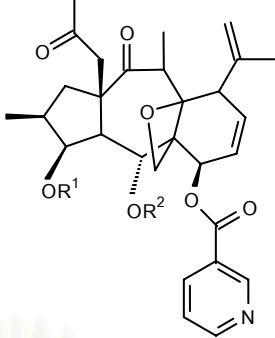
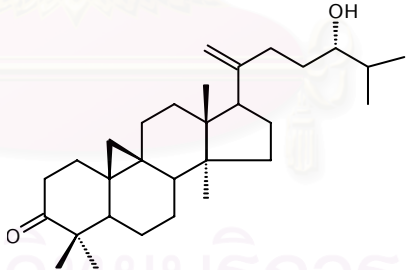
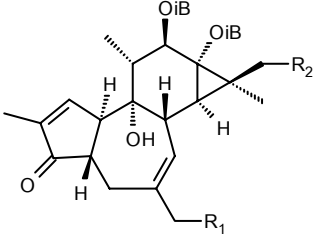
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia decipiens</i>	ต้น (Whole plant)	 <p>R¹ R² R³ R⁴</p> <ol style="list-style-type: none"> Bu Nic Ac H Decipinone A Bz H H Ac Decipinone B Bu H H Ac Decipinone C <p>   Bu=Butanoyl Bz=Benzoyl </p> <p>  Nic=Nicotinoyl </p> <p>(tricyclic lathyrane or myrsinol type skeleton diterpene)</p>  <p>Karajinone A</p>  <p>Karajinone B (diterpene ester with alathyrane skeleton)</p>	14, 15

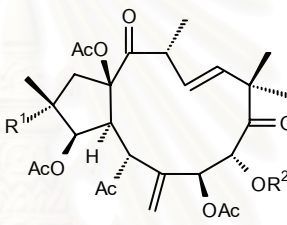
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia eabracteolata</i>	ราก (Root)	 <p>Yuexiandajisu A มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย</p>  <p>Yuexiandajisu B มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาว (Casbane diterpenoids)</p>	16
<i>Euphorbia esula</i>	ต้น (stem)	 <p>Esulatin D</p>  <p>Esulatin E (Jatropane diterpenoides)</p>	17
<i>Euphorbia fidjiana</i>	แก่น (heart wood)	 <p>ent-12-β-Hydroxymethyl-3-oxo-16-norpimar-8(14)-ene-15,21-Carbolactone</p>	18, 19

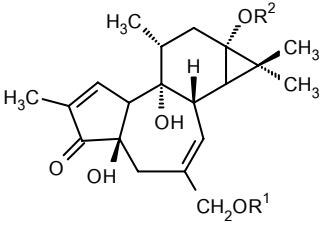
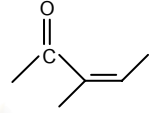
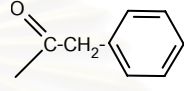
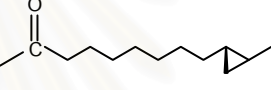
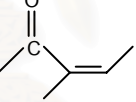
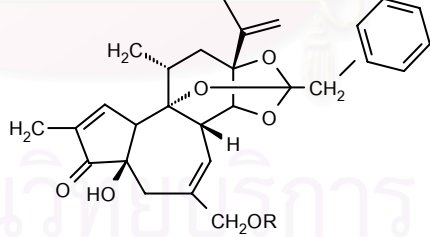
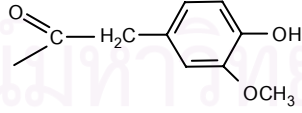
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
		 <p data-bbox="708 517 1123 607">ent-Abieta-8(14),13(15)-dien-16,12-olide (Jolkinolide E)</p>	
		 <p data-bbox="708 943 1123 1032">ent-8α,14α-Epocyabieta-11,13(15)-dien-16,12-olide (Jolkinolide A)</p>	
		 <p data-bbox="708 1368 1123 1458">ent-(13s)-Hydroxyatis-16-ene-3,14-dione (Antiquorin)</p>	
		 <p data-bbox="759 1794 1072 1883">ent-Atis-16-ene-3,14-dione (Deoxyantiquorin)</p>	

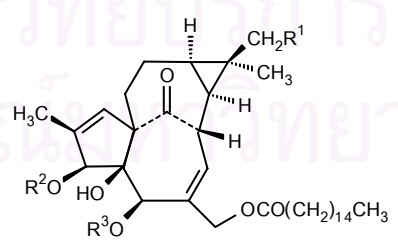
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia fisheriana</i>	ราก	 <p>Langduin B</p>  <p>Jolkinolide B</p>  <p>17-hydroxyjolkinolide B</p>	20
<i>Euphorbia humifusa</i>	ใบ (leaves)	 <p>Ellagic acid 4-O-β-D-glucopyranoside (Ellagic acid glycoside)</p>	21

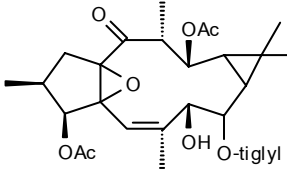
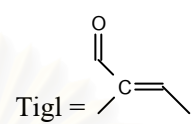
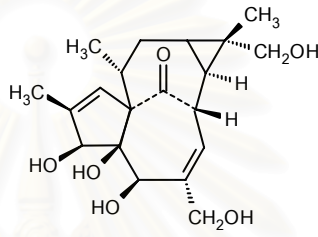
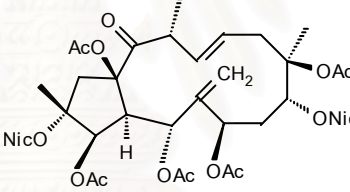
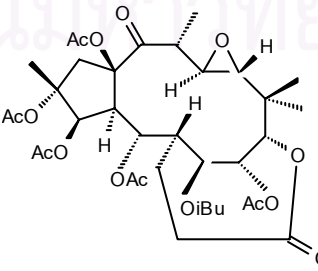
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<p><i>Euphorbia kansui</i> Liou.</p>	<p>ราก</p>	<p>Hydrolyzable Tannin ได้แก่</p> <ul style="list-style-type: none"> -Tellimagrandin I -Geraniin -Mallotusin -Eumaculin A,B -Corilagin -Chebulagic acid -Excoecarianin  <p>1,3,6-tri-O-galloyl-2-D-glucose (Euphormisin M₃)</p>  <p>R1 = COCH(Me)CH(Me)₂ R2 = CO(CH₂)₁₄Me R3 = CO(CH₂)₁₀Me</p> <p>13-hydroxyingenol-3-(2,3-dimethyl-butanoate)-13-dodecanoate-20-hexadecanoate (Kunsiiphorin A)</p> <p>มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งลำไส้เล็ก และมะเร็ง ผิวหนัง</p>	<p>22</p>

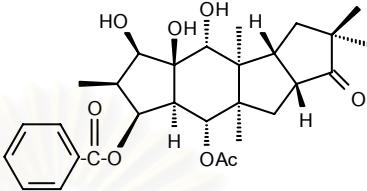
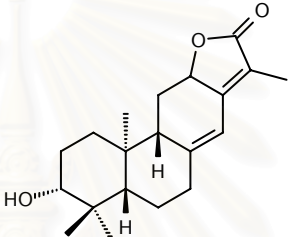
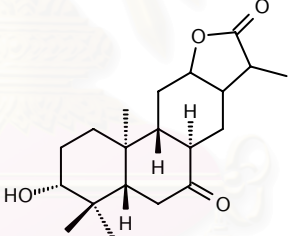
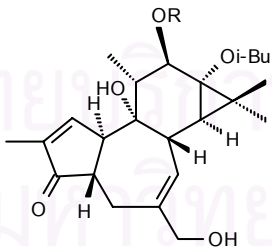
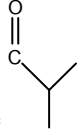
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia myrsinites</i>	ราก	 <p>1. $R^1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$, $R^2 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$ 15-O-acetyl-3,5-O-dipropionyl-7-O-nicotinylmyrsinol</p> <p>2. $R^1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$, $R^2 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 15-O-acetyl-3-O-propionyl-7-O-nicotinylmyrsinol</p> <p>3. $R^1 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R^2 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$ 15-O-acetyl-3-O-butanoyl-5-O-propionyl-7-O-nicotinylmyrsinol (tetracyclic diterpene tetraester)</p>	23
<i>Euphorbia nerifolia</i>	ยาง	 <p>9,19-cyclolanost-20(21)-en-24-ol-3-one (Neriifolione)</p>	24
<i>Euphorbia obtusifolia</i>	ยาง	 <p>iB = isobutyrate</p>	25

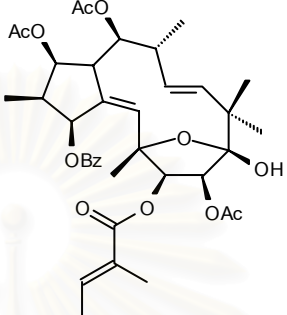
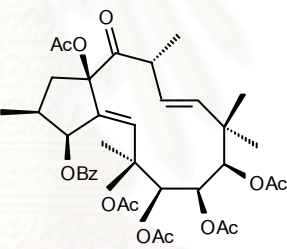
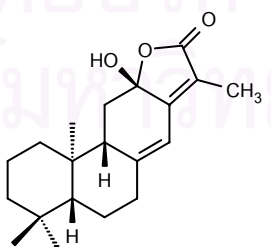
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia paralias</i>	ต้น (Whole plant)	<p>1. $R^1=H, R^2=H$ 4,20-Dideoxyphorbol 12,13-bis (isobutyrate)</p> <p>2. $R^1=OH, R^2=H$ 4-Deoxyphorbol 12,13-bis (isobutyrate)</p> <p>3. $R^1=OH, R^2=OAc$ 17-Acetoxy-4-deoxyphorbol 12,13- bis(isobutyrate)</p>  <p>MB=2-methylbutyrate iB=isobutyrate Bz=benzoate</p> <p>1. $R^1=OAc, R^2=Bz$ (2R*,3R*,4S*,5R*,7S*,8R*,13R*, 15R*)-2,3,5,7,15-Pentaacetoxy-8- benzoyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17), 11E-diene</p> <p>2. $R^1=OAc, R^2=iB$ (2R*,3R*,4S*,5R*,7S*,8R*,13R*, 15R*)-8-butyroyloxy-9,14dioxojatro pha-6(17),11E-diene</p> <p>3. $R^1=OAc, R^2=MB$ (2R*,3R*,4S*,5R*,7S*,8R*,13R*, 15R*)-8-(2ε-methylbutyroyloxy)- 9,14dioxojatropha-6(17),11E-diene</p>	26

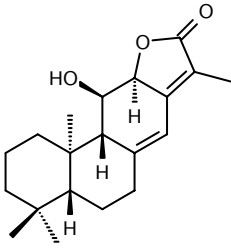
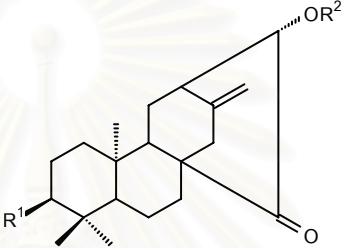
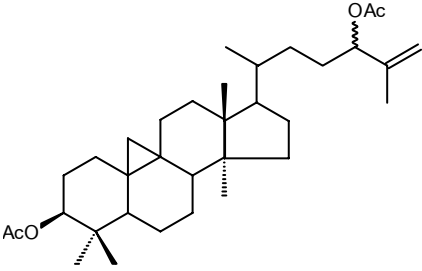
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia poissonii</i>	ยาง	 <p>1. $R^1 = \text{Ac}$, $R^2 =$ </p> <p>12-deoxyphorbol 20-acetate 13-angelate</p> <p>2. $R^1 = \text{Ac}$, $R^2 =$ </p> <p>12-deoxyphorbol 20-acetate 13-phenylacetate</p> <p>3. $R^1 = \text{H}$, $R^2 =$ </p> <p>12-deoxyphorbol 13-(9,10-methylene) underdecanoate</p> <p>4. $R^1 = \text{H}$, $R^2 =$ </p> <p>20-hydroxy-12-deoxyphorbol angelate</p>  <p>5. $R =$ </p> <p>Resiniferol 20-(4-hydroxy-3-methoxy phenylacetate) 9,13,14-ortho phenylacetate</p> <p>6. $R = \text{H}$</p> <p>20-Hydroxyresiniferol 9,13,14-orthophenylacetate</p>	27

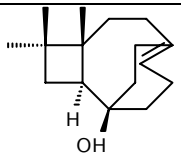
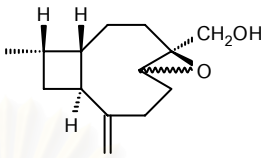
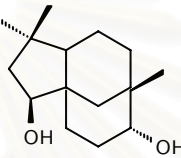
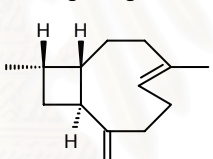
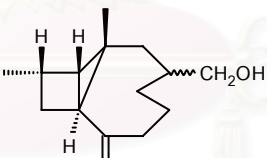
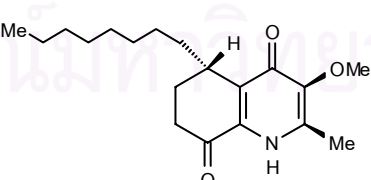
ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
		สาร 1, 2, 3, 5 และ 6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งไตของมนุษย์ (kidney carcinoma (A-498)) โดยเฉพาะสาร 2 และ 3 แสดงฤทธิ์สูงกว่ายา adriamycin ถึง 10 เท่า	
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	ยาง, ต้นและดอก	Sterol, Pulcherrol, Octacosanol, β -sitosterol, Germanicol, β -amyrin, Pseudotaraxasterol	28
<i>Euphorbia quinquecostata</i> Volk.	ต้น (Stem wood)	-ent-13S-hydroxyatis-16-ene-3,14-dione -2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone (Xanthoxylin) -2-hydroxy-4,6-dimethoxy-3-methoxyacetophenone -6-hydroxy-7-methoxycoumarin -Lupeol acetate - β -sitosterol -sitosterol- β -D-glucopyranoside -6,7,8-trimethoxycoumarin	29
		 <p>1. $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = H$ 17-hydroxyingenol-O-hexadecanoate</p> <p>2. $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H$ ingenol-20-hexadecanoate</p>	

ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<p><i>Euphorbia lacteal</i> Haw.</p>	<p>กิ่ง (branches)</p>	<p>-Phorbol, Ingenol, Lathyrols, Ingol</p>  <p>3,12-di-O-acetylingol-8-tiglate</p>  <p>Tigl = $\text{C}(\text{O})=\text{C}(\text{CH}_3)-$</p>  <p>16-hydroxyingenol</p>	<p>30</p>
<p><i>Euphorbia salicafolia</i></p>	<p>ต้น</p>	 <p>Euphosalicin Nic=nicotinoyl iBu=isobutanoyl</p> <p>มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิด multidrug resistance ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู ได้ดีกว่า verapamil</p>  <p>Salicinolide (Bishomoditerpene lactone)</p>	<p>31, 32</p>

ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia segetalis</i>	ต้น (Whole plant)	-Friedeline pentacyclic triterpene -Lupenone, Glutinol, β -sitosterol -Dammaradienol tetracyclic triterpene -24-methylene cycloartanol  Segetalol	33
<i>Euphorbia semiperfoliata</i>	ต้น (Aerial part)	 1. 3α -OH = Helioscopiolides A 2. 3β -OH = Helioscopiolides B  8 α ,14-dihydro-7-oxohelioscopinolide A  i-Bu =  1. R = Bz 12-O-benzoyl-13-O-isobutyryl-4-deoxyphorbol	34

ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia serrulata</i>	ต้น	<p>2. R= Tigl</p> <p>12-O-tigloyl-13-O-isobutyroyl-4-deoxyphorbol</p>  <p>Serrulatin A (unknown heterocyclic ring)</p>  <p>Serrulatin B</p>	35
<i>Euphorbia sessiliflora</i> Roxb. (เข้าคำ, ว่านพระนิม)	หัวใต้ดิน (Tubers)	<p>-Jolkinolide A, B</p> <p>-Stigmasterol, β-sitosterol</p>  <p>ent-12-hydroxy-12(R)-abieta-8(14),13(15)-diene-16,12-olide</p>	36

ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia sieboldiana</i>	ราก	 <p>ent-11α-hydroxyabieta-8(14),13(15)-diene-16,12α-olide</p>  <p>1. R¹ = =O, R² = H ent-13R-hydroxy-atis-16-en-3,14-dione (Antiquorin)</p> <p>2. R¹ = OH, R² = H ent-13,3β-dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene</p>	37
<i>Euphorbia trigona</i> Haw. (สลัดไดบ้าน, เค็ยะฮั่ว)	ต้น (Stem)	<p>-Taraxerol, Taraxeryl acetate</p> <p>-Friedelan-3-β-ols, Friedelan- 3α-ols</p> <p>-Cycloarterol</p> <p>-24-methylene cycloartanol</p> <p>-β-amyrins, α-amyrins</p> <p>-Lupeol, sitosterol</p>  <p>cycloart-25-ene-3β,24-diol</p>	38

ชื่อพืช	ส่วนที่ศึกษา	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Euphorbia wangii</i>	ต้นและใบ (Whole plant)	 <p>Cyclocaryophylla-4-en-8-ol</p>  <p>14-hydroxy-4β,5α-epoxy-4,5-dihydrocaryophyllene</p>  <p>Clovandiol (Sesquiterpenes)</p>  <p>β-caryophyllene</p>  <p>Euphanginol (Caryophyllene derivative)</p>	39
<i>Antidesma membranaceum</i> Mull. Arg. และ <i>Antidesma venosum</i>	ใบ	 <p>(S)-4,8-dioxo-3-methoxy-2-methyl-5-n-octyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline[(S)-2] (Antidesmone)</p>	40

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 พืชตัวอย่าง

แก่นของต้นสลัดไดซึ่งจากร้านเวชพงศ์โอสถและนำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างแห้งที่หอพันธุ์ไม้กรมป่าไม้ตรงกับตัวอย่างเลขที่ BKF21038 นำมาตากแห้งประมาณ 2-3 สัปดาห์ และนำมาบดละเอียด แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของแก่นสลัดได

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

1. ^1H NMR และ ^{13}C NMR

บันทึกด้วยเครื่อง Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (FT-NMR) model AC-F200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ สำหรับหาโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา โดยวัดค่าเคมีคัลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม(ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี(CDCl_3) หรือ สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี₆(DMSO-d_6) น้ำหนักของสารตัวอย่างที่ใช้วัดโปรตอนสเปกตราประมาณ 10-20 มิลลิกรัม และประมาณ 20-50 มิลลิกรัม สำหรับวัดคาร์บอนสเปกตรา ที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส

2. อินฟราเรดสเปกตรา (IR Spectra)

บันทึกด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact model 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยผสมกับโปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (Pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

3. แมสสเปกตรา (MS)

บันทึกด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) GC model 8000-MS model Trio 2000 ของบริษัท Fisons Instruments ประเทศอังกฤษ ใช้ Electron Impact source (EI) ซึ่งมีความต่างศักย์ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180-300 องศาเซลเซียส สำหรับบันทึกแมสสเปกตรา

4. จุดหลอมเหลว (Melting point)

ใช้เครื่อง Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาจุดหลอมเหลว

5. Polarimeter

บันทึกด้วยเครื่อง Polarimeter model 341ของบริษัท Perkin Elmer สำหรับวัดค่า Specific optical rotation

6. อัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี (Ultraviolet-Visible Spectroscopy)

บันทึกด้วยเครื่อง Hewlett Packard 8452 (A diode array Spectrophotometer in chlorofom)

7. เอกซ์-เรย์ สเปกโตรสโกปี (X-Ray Spectroscopy)

บันทึกด้วยเครื่อง Bruker Smart Diffractometer ใช้ graphite monochromated MoK α -radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) ที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) สำหรับตรวจวัดโครงสร้างผลึก

8. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator)

ของบริษัท Buchi สำหรับระเหยแยกสารละลายจากสารสกัด

3.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ใช้ตัวทำละลายชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (Commercial grade) โดยนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้งเพื่อทำให้บริสุทธิ์ ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เอทิลเอซิเตต, เอทานอล, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม และอะซิโตน

2. ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7734 ของบริษัท E.Merck สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3. TLC aluminium sheet silicagel 60G F₂₅₄ ของบริษัท E.Merck สำหรับทำทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี

4. สารเคมีที่ใช้ในการละลายสารบริสุทธิ์เพื่อวัด ¹H NMR และ ¹³C NMR Spectra ใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี (CDCl₃) หรือ สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี₆ (DMSO-d₆) NMR grade ของบริษัท E.Merck

5. สารเคมีโปรตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) สำหรับวัดค่าอินฟราเรดสเปกตรัม

3.4 วิธีการสกัด

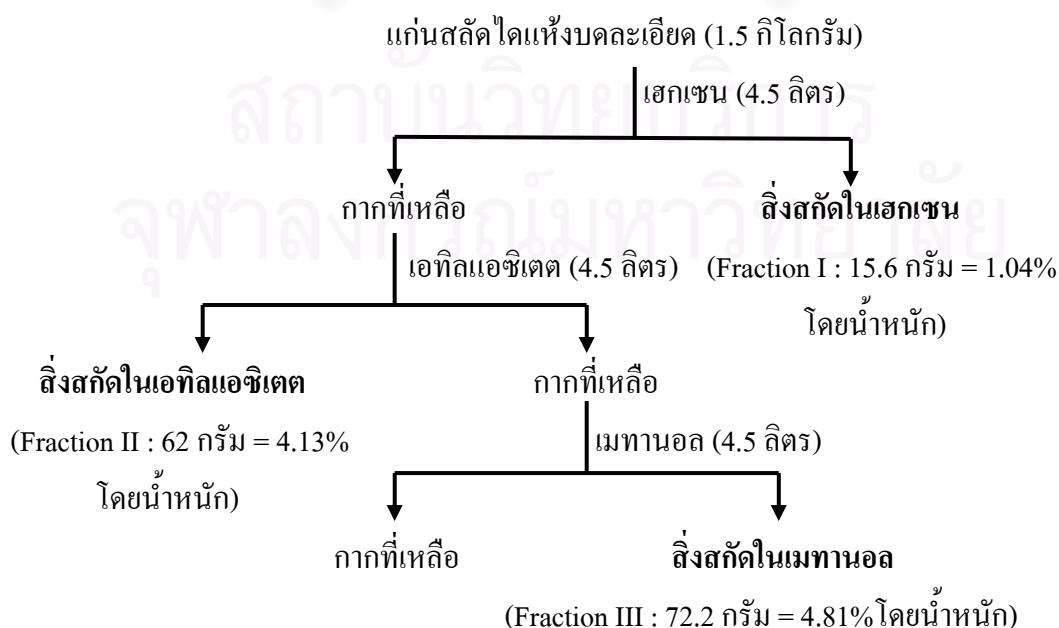
สมุนไพรแก่นสลัดไดซึ่งจากร้านเวชพงศ์ไอสถ ผ่านการตากแห้งและบดเป็นผงละเอียด นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามแผนภาพที่ 1 และมีรายละเอียดขั้นตอนดังต่อไปนี้ ผลที่ได้ดังตารางที่ 3 ในผลการทดลอง

3.4.1. การสกัดด้วยเฮกเซน นำแก่นสลัดไคผงหนัก 1.5 กิโลกรัม แช่ในเฮกเซนปริมาตร 4.5 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 6-7 วัน แล้วนำสารสกัดหยาบ ที่ได้มากรองแยกกาก และกลั่นแยกเฮกเซนออกจนเกือบหมด นำเฮกเซนที่กลั่นได้นี้กลับมาสกัดแก่นสลัดไคอีก ทำเช่นนี้ซ้ำอีกหลายครั้งจนกระทั่งสารสกัดหยาบที่แช่ไว้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด จะได้สิ่งสกัดในเฮกเซนกำหนดเป็นสารสกัดส่วนที่1 (Fraction I) มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นเหนียวสีเหลืองอ่อนหนัก 15.6 กรัม (1.04% โดยน้ำหนัก)

3.4.2. การสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำกากแก่นสลัดไคที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซนแล้ว นำมาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้สิ่งสกัดในเอทิลแอลกอฮอล์กำหนดเป็นสารสกัดส่วนที่2 (Fraction II) มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นเหนียวสีน้ำตาลแดงหนัก 62 กรัม (4.13% โดยน้ำหนัก)

3.4.3. การสกัดด้วยเมทานอล นำกากแก่นสลัดไคที่ผ่านการสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แล้ว นำมาสกัดด้วยเมทานอล ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้สิ่งสกัดในเมทานอลกำหนดเป็นสารสกัดส่วนที่3 (Fraction III) มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นเหนียวสีน้ำตาลแดงหนัก 72.2 กรัม (4.81% โดยน้ำหนัก) ขั้นตอนการสกัดสรุปได้ดังแผนภาพที่1 และผลของการสกัดได้ดังตารางที่ 3 ในผลการทดลอง

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดสารจากแก่นสลัดไค



3.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดจากแก่นสลัดได

3.5.1. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 15.6 กรัม (Fraction I) มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ หนัก 120 กรัม ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกันเรียงจากควมมีขั้วน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตด เอทิลเอซิเตด สารละลายผสมระหว่างเอทิลเอซิเตดกับเมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 100 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปตั้งไว้ในอ่างน้ำเดือดหรือกลั่นแบบธรรมดา เพื่อให้ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ และหาค่า R_f โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำให้เดือด และตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซนแสดงไว้ในส่วนของผลการทดลอง

3.5.2. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตดโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตดหนัก 62 กรัม (Fraction II) มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ หนัก 340 กรัม ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกันเรียงจากควมมีขั้วน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตด เอทิลเอซิเตด สารละลายผสมระหว่างเอทิลเอซิเตดกับเมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 250 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปตั้งไว้ในอ่างน้ำเดือดหรือกลั่นแบบธรรมดา เพื่อให้ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ และหาค่า R_f โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำให้เดือด และตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตดแสดงไว้ในส่วนของผลการทดลอง

3.5.3. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอลโดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

สิ่งสกัดในเมทานอลไม่ได้ถูกนำมาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี เนื่องจากในการตรวจสอบหาสภาวะของตัวชะที่เหมาะสมด้วยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) ไม่ปรากฏโมเลกุลที่แยกออกมาให้เห็นได้อย่างชัดเจน แต่เห็นเป็นลักษณะของสารที่รวมกันอยู่เป็นกลุ่มไม่สามารถแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้ จึงไม่ทำการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล

3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิดKato-3 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดBT474 เซลล์มะเร็งปอดชนิด Chago เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิดSW620 และเซลล์มะเร็งตับชนิดHep-G2 ทำการทดสอบและตรวจวัดด้วยวิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric method (41, 42, 43) โดยอาศัยหลักการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตและการเจริญของเซลล์ โดยดูผลของการใช้ เอนไซม์ succinate dehydrogenase จากไมโทคอนเดรีย ย่อยสลายสาร tetrazolium salt MTT ทำให้เกิดสารฟอร์มazan (formazan) ซึ่งมีสีฟ้า ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด ให้ผลเร็วและปลอดภัยกว่าวิธีที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมเซลล์เริ่มต้น

เซลล์มะเร็งที่นำมาใช้ทดสอบเป็นเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว นำมาเพาะเลี้ยงใน tissue culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5% ในตู้ Humidified atmosphere ที่มีCO₂ 5% ในอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ 100% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน เซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ Exponential phase ที่มีความเข้มข้น 2-4 x 10⁶ เซลล์/ขวด (ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยสีย้อม trypan blue) หลังจากนั้นดูดอาหารเก่าออก เติม 0.05%trypsin และ 0.01%EDTA 2 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที จากนั้นดูด trypsin ทิ้ง และเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้น 5 x 10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เก็บไว้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการทดสอบฤทธิ์ทาง

ชีวภาพต่อไป

2. เตรียมสารที่ต้องการทดสอบ

เตรียมสารหรือยาที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 95% เอทานอล จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ0.0001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับเพื่อหาค่า IC₅₀

3. เตรียมสารละลายMTT

เตรียมสารละลาย MTT ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน normal saline โดยต้องละลาย MTT จนหมดไม่มีตะกอน เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4°C ไว้ได้นาน 1 เดือน

4. ขั้นตอนการทดสอบ

1. เติมน้ำเซลล์เริ่มต้นปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน microtiter plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 100 ไมโครลิตร/หลุม (ความเข้มข้นของเซลล์ 5×10^3 เซลล์/หลุม) บ่มไว้ที่ 37°C ในตู้ Humidified atmosphere นาน 24 ชั่วโมง
2. เติมน้ำสารหรือยาที่ต้องการทดสอบลงไปปริมาณ 2 ไมโครลิตร/หลุม บ่มไว้ นาน 72 ชั่วโมง
3. เติมน้ำสารละลาย MTT ปริมาณ 10 ไมโครลิตร/หลุม บ่มไว้ นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง และเติมน้ำ DMSO ปริมาณ 150 ไมโครลิตร/หลุม เขย่าบน plate mixer นาน 5 นาที
4. เติมน้ำ 0.1M glycine buffer pH 10.5 ปริมาณ 25 ไมโครลิตร/หลุม เขย่าบน plate mixer นาน 5 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารฟอรัมาซาลที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

5. การคำนวณ

1. อัตราการรอดตายของเซลล์ (%cell survival; PS)

$$\% \text{ cell survival} = \frac{\text{OD test}}{\text{OD control}} \times 100$$

IC_{50} = Inhibition Concentration at 50% cell survival

2. อัตราการเจริญของเซลล์ (%cell growth; PG)

$$\text{ถ้า } \text{OD test} - \text{OD t zero} \geq 0 ; \text{ PG} = \frac{(\text{OD test} - \text{OD t zero})}{(\text{OD control} - \text{OD t zero})} \times 100$$

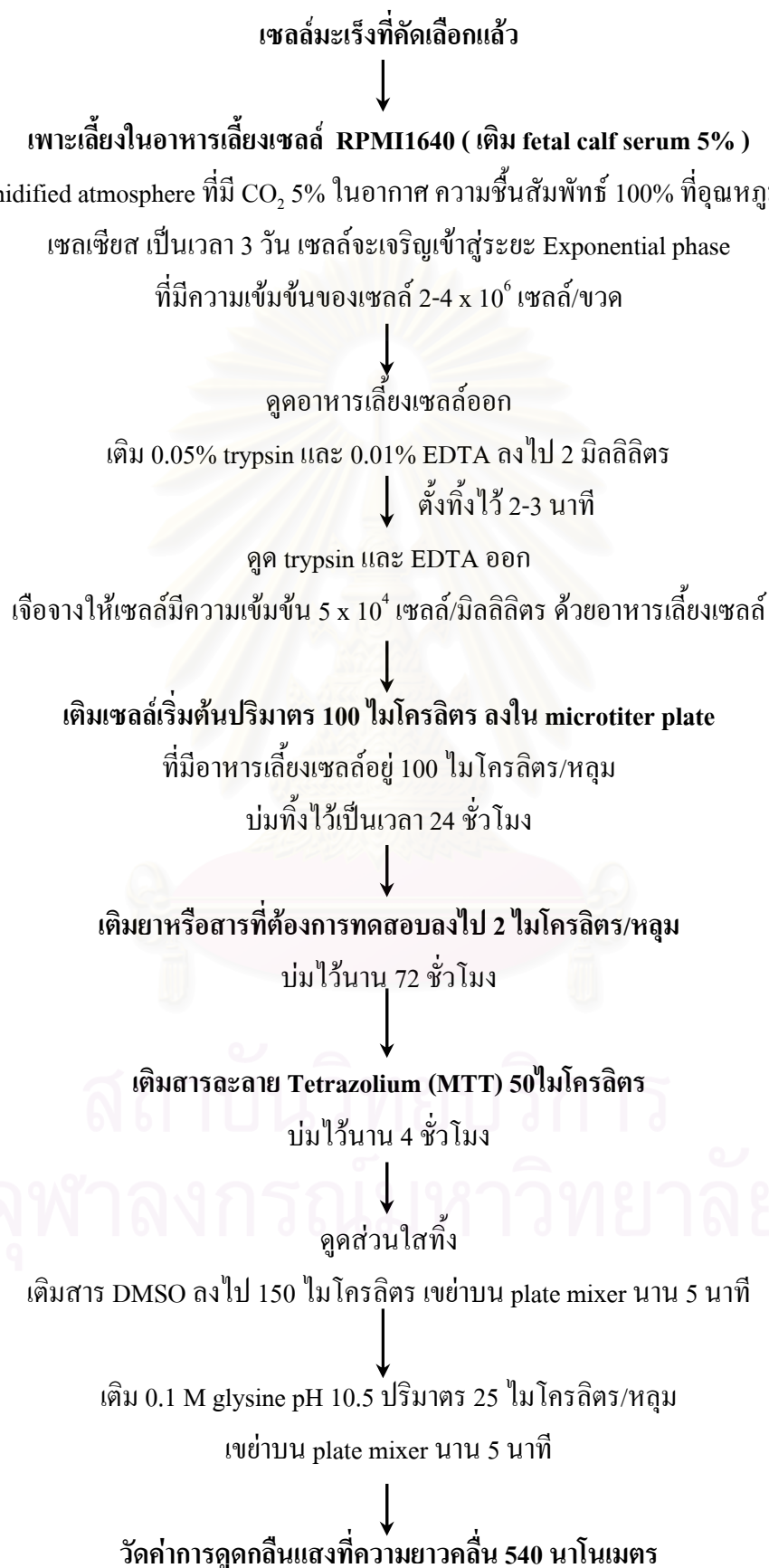
$$\text{ถ้า } \text{OD test} - \text{OD t zero} < 0 ; \text{ PG} = \frac{(\text{OD test} - \text{OD t zero})}{\text{OD t zero}} \times 100$$

OD t zero = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเลี้ยงเซลล์ไว้ 1 วันก่อนเติมน้ำสารทดสอบ

OD test = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมน้ำสารทดลองแล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 72 ชั่วโมง

Odcontrol = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 72 ชั่วโมงโดยไม่เติมน้ำสารทดสอบ

แผนภาพที่ 2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็ง



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสิ่งสกัดที่สกัดได้จากแก่นสลัดได

หลังจากนำแก่นสลัดไดผงหนัก 1.5 กิโลกรัม มาสกัดด้วยการแช่ในเฮกเซน 4.5 ลิตร เอทิลเอซเตต 4.5 ลิตร และเมทานอล 4.5 ลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายที่ได้และนำไปกลั่นแยกตัวทำละลายออกจนหมด ได้ผลสิ่งสกัดในเฮกเซน เอทิลเอซเตต และเมทานอลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของสิ่งสกัดที่สกัดได้จากแก่นสลัดได

น้ำหนักของ แก่นสลัดไดผง	น้ำหนักและเปอร์เซ็นต์ yield (% โดยน้ำหนัก)		
	สิ่งสกัดในเฮกเซน	สิ่งสกัดในเอทิลเอซเตต	สิ่งสกัดในเมทานอล
1.5 กิโลกรัม	ลักษณะเป็นของเหลวข้น เหนียวสีเหลืองอ่อน หนักเท่ากับ 15.6 กรัม (1.04%)	ลักษณะเป็นของเหลว หนืดสีน้ำตาลแดง หนักเท่ากับ 62 กรัม (4.13%)	ลักษณะเป็นของเหลว หนืดสีน้ำตาลแดง หนักเท่ากับ 72.2 กรัม (4.81%)

4.2 ผลการศึกษารูปประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดจากแก่นสลัดได

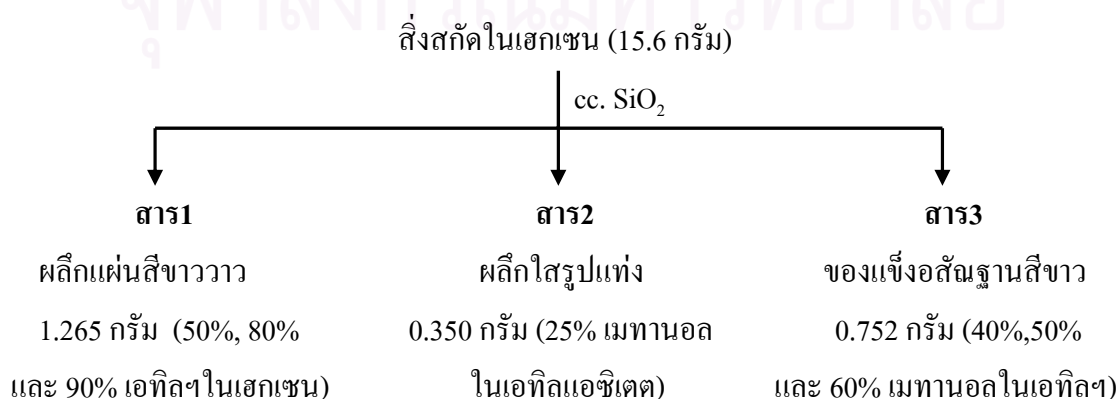
4.2.1. ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 15.6 กรัม (Fraction I) มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ หนัก 120 กรัม ไซโคลฮีกซ์อิมป์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกันเรียงจากความมีขั้วน้อยไปหามาก เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ และหาค่า R_f โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี(TLC) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำให้เดือด และตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซนแสดงไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดเฮกเซนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดย ปริมาตร)	ลำดับ ส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก สาร (กรัม)	R _f
F ₁	Hex : EtoAc 100 : 0	1 – 15	น้ำมันสีขาวใส	0.080	0.00
F ₁ 2	90 : 10	16 – 35	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีส้ม	0.089	0.12
F ₁ 3	75 : 25	36 – 69	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.062	0.20
F ₁ 4	50 : 50	70 – 102	ผลึกแผ่นสีขาวขุ่นในน้ำมันสีเหลือง	0.632	0.25
F ₁ 5	20 : 80	103 – 151	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเขียวเข้ม	0.488	0.28
F ₁ 6	10 : 90	152 – 189	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.702	0.30
F ₁ 7	EtoAc : Met 100 : 0	190 – 269	น้ำมันสีเหลือง	0.529	-
F ₁ 8	90 : 10	270 – 311	น้ำมันสีเขียวเข้ม	0.312	-
F ₁ 9	75 : 25	312 – 356	ผลึกใสรูปแท่งในน้ำมันสีเหลือง	0.410	0.30
F ₁ 10	75 : 25	357 – 389	น้ำมันสีน้ำตาล	0.173	-
F ₁ 11	60 : 40	390 – 440	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.536	0.42
F ₁ 12	50 : 50	441 – 482	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.312	0.42
F ₁ 13	40 : 60	483 – 520	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.118	0.45
F ₁ 14	25 : 75	521 – 557	น้ำมันสีเหลือง	0.321	-
F ₁ 15	0 : 100	558 - 590	น้ำมันสีเหลือง	0.410	-

แผนภาพที่ 3 สารที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน



4.2.2. ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตตโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตตหนัก 62 กรัม (Fraction II) มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ หนัก 340 กรัม ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่าง ๆ กันเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ และหาค่า R_f โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี(TLC) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดและตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตตแสดงไว้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตตโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดย ปริมาตร)	ลำดับ ส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก สาร (กรัม)	R_f
	Hex : EtoAc				
F ₂ 1	100 : 0	1 – 4	น้ำมันสีขาวใส	0.102	0.00
F ₂ 2	100 : 0	5 – 15	ของแข็งสีขาว	0.041	0.13
F ₂ 3	90 : 10	16 – 34	น้ำมันสีเหลือง	0.580	-
F ₂ 4	90 : 10	35 – 43	ผลึกใสรูปเข็ม	0.407	0.37
F ₂ 5	80 : 20	44 – 59	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.558	0.37
F ₂ 6	80 : 20	60 – 70	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล	0.825	0.38
F ₂ 7	75 : 25	71 – 78	ผลึกใสในน้ำมันสีเหลือง	0.325	0.40
F ₂ 8	75 : 25	79 – 86	ผลึกสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล	0.236	0.43
F ₂ 9	75 : 25	87 – 110	ของแข็งสีขาว	0.035	0.48
F ₂ 10	75 : 25	111 – 130	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.210	0.50
F ₂ 11	75 : 25	131 – 142	ของแข็งสีขาว	0.058	0.50
F ₂ 12	60 : 40	143 – 170	น้ำมันสีน้ำตาล	0.614	-
F ₂ 13	60 : 40	171 – 214	ของแข็งสีขาว	0.235	0.76
F ₂ 14	50 : 50	215 – 238	ผลึกใสรูปเข็ม	0.055	0.71
F ₂ 15	50 : 50	239 – 257	ของแข็งสีขาว	0.472	0.60
F ₂ 16	50 : 50	258 – 309	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.256	0.62
F ₂ 17	40 : 60	310 – 342	น้ำมันสีเหลือง	0.520	-
F ₂ 18	40 : 60	343 – 396	น้ำมันสีเหลือง	0.253	-

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดย ปริมาตร)	ลำดับ ส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก สาร (กรัม)	R _f
	Hex : EtoAc				
F ₂ 19	40 : 60	397 – 412	น้ำมันสีเหลือง	0.426	-
F ₂ 20	25 : 75	413 – 422	ของแข็งสีน้ำตาล	0.148	0.65
F ₂ 21	25 : 75	423 – 431	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล	0.151	0.71
F ₂ 22	20 : 80	432 – 441	ของแข็งสีเหลืองในน้ำมันสีน้ำตาล	0.666	0.73
F ₂ 23	20 : 80	442 – 451	ของแข็งสีน้ำตาล	0.289	0.52
F ₂ 24	10 : 90	452 – 461	ของแข็งสีน้ำตาล	0.725	0.71
F ₂ 25	10 : 90	462 – 477	ของแข็งสีน้ำตาล	0.631	0.63
	EtoAc : Met				
F ₂ 26	100 : 0	478 – 483	ของแข็งสีน้ำตาล	0.349	0.65
F ₂ 27	75 : 25	484 – 542	น้ำมันสีน้ำตาล	0.105	-
F ₂ 28	50 : 50	543 – 587	น้ำมันสีน้ำตาล	0.782	-
F ₂ 29	0 : 100	588 – 630	น้ำมันสีน้ำตาล	0.563	-

แผนภาพที่ 4 สารที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลเอซิเตต



4.3 ผลการทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

4.3.1. ผลการทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 1 มีลักษณะเป็นผลึกแผ่นสีขาวขุ่นในน้ำมันสีเหลือง ได้จากส่วนที่ 70–102 (F₁4), 103–151 (F₁5) และ 152–189 (F₁6) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 50:50, 80:20 และ 90:10 อัตราส่วนโดยปริมาตรตามลำดับ นำสาร 1 กรองแยกออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันสีเหลือง และล้างน้ำมันออกด้วย สารละลายผสม 5% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน จะได้ผลึกเป็นแผ่นขาวสีขุ่นหนัก 0.412 กรัม ในส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวในน้ำมัน กรองแยกของแข็งออกจากส่วนที่เป็นน้ำมัน และนำมาตกผลึกด้วยสารละลายผสม 10% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซนร้อน ได้แผ่นผลึกสีขาวหนัก 0.853 กรัม ดังนั้นสาร 1 ที่ได้ทั้งหมดมีน้ำหนัก 1.265 กรัม (0.084% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 145 - 146 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.3 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน) สาร 1 ละลายได้ดีใน เอทิลเอซิเตต คลอโรฟอร์ม เอทานอล และเมทานอล ละลายได้น้อยในเฮกเซน และจากการวิเคราะห์สาร 1 ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี เพื่อการดูดกลืนแสงของสาร ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร (log ϵ = 1.91) สำหรับการวัดค่าการหมุนของโมเลกุล (Specific optical rotation) ด้วยเครื่อง Polarimeter พบว่าสาร 1 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ +8.2° (CHCl₃; c=0.3) ($[\alpha]_D^{25} = +5.5^\circ$) (19)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (Vmax) : 2962(s), 2933 (s), 1700(s), 1660(m), 1648 (m), 1453(s), 1430(s) และ 887(s) เซนติเมตร⁻¹ (รูปที่ 11)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) : 0.84(3H,s,H-20), 0.90(1H,m,H-7 α), 0.98(3H,s, H-19), 1.05(3H,s,H-18), 1.22(1H,dd,J=11.8, 2.4Hz,H-5), 1.33(1H,m,H-1 α), 1.58(1H,m,H-6 α), 1.65(1H,m,H-6 β), 1.66(1H,m,H-9), 1.81(1H, m,H-11 β), 1.95(1H,brt,H-11 α), 2.30(1Hm,H-15), 2.31(1H,m,H-13'), 2.33(1H,m,H-13), 2.35(1H, m,H-7 β), 2.35(1H,m,H-2 α), 2.36(1H,m,H-15), 2.46(1H,ddd,J=27.3,13.6,4.5Hz,H-2 β), 2.68 (1H, t,J=2.8 Hz,H-12), 4.64(1H,d,J=1.3Hz,H-17) และ 4.86(1H,d,J=1.0Hz,H-17) ppm (รูปที่ 12) (ตารางที่ 9)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 12.75, 20.00, 21.82, 25.95, 27.85, 31.16, 34.08, 37.16, 37.59, 38.32, 42.59, 44.54, 47.60, 47.67, 51.82, 55.30, 107.14, 147.05, 216.39 และ 216.50 ppm (รูปที่ 13) (ตารางที่ 10)

DEPT-135 ¹³C NMR (CDCl₃)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH₃, CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 55.30, 51.89, 38.32, 25.95, 21.82 และ 12.75 ppm (รูปที่ 13) (ตารางที่ 10)

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) : 20.00, 27.85, 31.16, 31.08, 37.16, 42.59, 44.54 และ 107.14 ppm (รูปที่ 13) (ตารางที่ 10)

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณ CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 38.32, 51.82 และ 55.30 ppm (รูปที่ 13) (ตารางที่ 10)

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม และเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไดเทอร์ปีน จึงนำสาร 1 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 14 ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ $300[\text{M}^+](100)$, $215(21)$, $105(27)$, $91(43)$, $69(17)$ และ $55(24)$ (รูปที่ 14)

เนื่องจากสาร 1 มีลักษณะเป็นแผ่นผลึกบางทำให้ไม่สามารถศึกษาโครงสร้างของผลึกโดยวิธีเอกซ์-เรย์ ได้ ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างจึงต้องใช้เพียงข้อมูลดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

4.3.2. ผลการทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้าง

สาร 2 มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปแท่งในน้ำมันสีเหลืองและของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากส่วนที่ 312–356 (F_19) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลเอซิเตดกับเมทานอล 75:25 อัตราส่วนโดยปริมาตร และจากส่วนที่ 35–43 (F_24), 44–59 (F_25), 60–70 (F_26), 71–78 (F_27) และ 79–86 (F_28) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตด (ตารางที่ 5) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตด 90:10, 80:20 และ 75:25 อัตราส่วนโดยปริมาตรตามลำดับ นำสาร 2 กรองแยกออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันสีเหลืองและล้างน้ำมันที่เหลือออกด้วย สารละลายผสม 10% เอทิลเอซิเตดในเฮกเซน นำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทิลเอซิเตดในเฮกเซน ร้อน จะได้ผลึกรูปแท่งหนัก 2.506 กรัม (0.167% โดยน้ำหนักของแก่นสลัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 162 - 163 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 (ซิลิกาเจล : 25% เอทิลเอซิเตดในเฮกเซน) สาร 2 ละลายได้ดีใน เอทิลเอซิเตด คลอโรฟอร์ม เอทานอล และเมทานอล ละลายได้น้อยในเฮกเซน และจากการวิเคราะห์สาร 2 ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี เพื่อดูการดูดกลืนแสงของสาร ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร ($\log \epsilon = 2.01$) สำหรับการวัดค่าการหมุนของโมเลกุล (Specific optical rotation) ด้วยเครื่อง Polarimeter พบว่าสาร 2 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ $+46.3^\circ$ (CHCl_3 ; $c=0.3$) ($\lambda_{\text{max}} = 298$, $[\alpha]_D^{25} = +44^\circ$) (5)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (Vmax) : 3437(s), 1726 (s), 1690(s), 1076(m) และ 909(m) เซนติเมตร⁻¹(รูปที่ 15)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) : 0.82(3H,s,H-20), 0.90(1H,m,H-7), 0.98(3H,s,H-18), 1.06(3H,s,H-19), 1.41(1H,ddd,J=20.1, 12.9,4.3Hz,H-1 β), 1.53(1H,s,H-6 β), 1.54(1H,s,H-6 α), 1.58(1H,dd,J=11.0,6.0Hz,H-9 α), 1.73(1H, m,H-11 β), 1.81(1H,m,H-1 α), 1.97(1H,ddd,J=13.2,3.6,3.6Hz,H-11 α), 2.29(1H,m,H-2 β), 2.32 (1H,m,H-2 β), 2.40(1H,dd,J=4.9,3.2Hz,H-7 β), 2.56(1H,ddd,J=15.8,6.3,2.6Hz,H-2 α), 2.76(1H,dd, J=5.87,2.89Hz,H-12 α), 3.85(1H,d,J=2.8Hz,H-13 β), 4.83(1H,s,H-17) และ4.99(1Hs,H-17) ppm (รูปที่16) (ตารางที่17)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 13.65, 19.91, 21.85, 25.31, 26.13, 30.36, 34.05, 36.66, 37.51, 43.62, 44.77, 47.27, 47.46, 51.04, 55.08, 75.05, 111.05, 142.27, 216.14 และ218.06 ppm (รูปที่17) (ตารางที่18)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 13.65, 21.85, 26.13, 44.77, 51.04, 55.08 และ75.05 ppm (รูปที่17) (ตารางที่18)

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) : 19.95, 25.35, 30.31, 34.07, 36.70, 43.71 และ111.1 ppm (รูปที่17) (ตารางที่18)

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณ CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 44.80, 51.51, 55.15 และ75.15ppm (รูปที่17) (ตารางที่18)

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมและเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 2 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไดเทอร์ปีน จึงนำสาร 2 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดู ไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 18 ซึ่งจะเห็นว่าพบ ไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ $316[\text{M}^+]$ (100), 273(5), 259(12), 173(8), 171(7), 161(21), 150 (22), 133(20), 107(21), 105(37) และ91(22) (รูปที่18) และจากการศึกษาโครงสร้างผลึกของสาร 2 โดยวิธีเอกซ์-เรย์ ได้ข้อมูลดังตารางที่ 12, 13, 14, 15 และ16

4.3.3. ผลการทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 3 มีลักษณะเป็นของแข็งอัสฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากส่วนที่ 390–440 (F_1 11), 441–482 (F_1 12) และ483–520 (F_1 13) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลเอซิเตดกับเมทานอล 60:40, 50:50 และ 40:60 อัตราส่วนโดยปริมาตรตามลำดับ และจากส่วนที่ 87–110 (F_2 9), 111–130 (F_2 10) และ 131–142 (F_2 11) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตด (ตารางที่5) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตด 75:25 อัตราส่วนโดยปริมาตร กรองแยก

ของแข็งออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันสีเหลืองและล้างน้ำมันที่เหลือออกด้วยสารละลายเอทิลเอซิเตต จนกระทั่งได้ของแข็งสีขาวบริสุทธิ์หนัก 0.941 กรัม (0.062% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 222 - 223 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.43 (ซิลิกาเจล : 25% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน) สาร 3 ละลายได้ดีในเอทิลเอซิเตต คลอโรฟอร์ม เอทานอลและเมทานอล ละลายได้น้อยในเฮกเซน และจากการวิเคราะห์สาร 3 ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ตสเปกโตรสโกปี เพื่อดูการดูดกลืนแสงของสาร ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 286 นาโนเมตร ($\log \epsilon = 4.13$) สำหรับการวัดค่าการหมุนของโมเลกุล (Specific optical rotation) ด้วยเครื่อง Polarimeter พบว่าสาร 3 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ $+142.8^\circ$ (CHCl_3 ; $c=0.3$) ($\lambda_{\max} = 288$, $[\alpha]_D^{25} = +130^\circ$) (19)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (Vmax) : 3006(w), 1762 (s), 1677 (w), 1654(m), 1442(w), 1390(w), 1221(m) และ 845(m) เซนติเมตร⁻¹ (รูปที่19)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) : 0.70(3H,s,H-20), 0.84(3H,s,H-19), 0.93(3H,s,H-18), 1.20(2H,m,H-3), 1.36,1.83(2H,m,H-1), 1.55,1.64(2H,m,H-6), 1.61,2.12(2H,m,H-7), 2.04(3H,s,H-17), 2.09,2.29(2H,m,H-2), 2.60(1H,d, $J=5.3\text{Hz}$,H-9), 3.47(1H,s,H-5), 3.69(1H,s,H-14) และ 5.43(1H,d, $J=5.3\text{Hz}$,H-11) ppm (รูปที่20) (ตารางที่20)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 8.67, 15.00, 18.44, 20.67, 21.92, 33.50, 33.50, 34.14, 39.67, 41.50, 41.50, 51.63, 53.47, 61.18, 104.10, 125.19, 145.03, 147.46 และ 170.62 ppm (รูปที่21) (ตารางที่21)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 8.67, 15.00, 21.92, 33.50, 51.63, 53.49, 54.47 และ 104.10 ppm (รูปที่21) (ตารางที่21)

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) : 18.44, 20.67, 34.14, 39.67 และ 41.50 ppm (รูปที่21) (ตารางที่21)

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณ CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 51.63, 53.49, 54.47 และ 104.10 ppm (รูปที่21) (ตารางที่21)

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมและเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 3 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไดเทอร์ปีน จึงนำสาร 3 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 22 ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ 314(M^+) (10), 177(20), 176(50), 160(20), 148(16), 119(45), 95 (70), 91(62), 81(71) และ 69(100) (รูปที่22)

4.3.4. ผลการทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 4 เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว ได้จากส่วนที่ 171–214 (F_2 13) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต (ตารางที่5) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 60:40 อัตราส่วนโดยปริมาตร กรองแยกของแข็งออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันสีเหลืองและล้างน้ำมันที่เหลือออกด้วยสารละลายเอทิลเอซิเตต จนกระทั่งได้ของแข็งเป็นผงละเอียดสีขาวบริสุทธิ์หนัก 0.230 กรัม (0.015% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 165 - 166 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.76 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน) สาร 4 ละลายได้ดีใน เอทิลเอซิเตต คลอโรฟอร์ม เอทานอล และเมทานอล ละลายได้น้อยในเฮกเซน และจากการวิเคราะห์สาร 4 ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ตสเปกโตรสโกปี เพื่อการดูดกลืนแสงของสาร ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 242 นาโนเมตร ($\log \epsilon = 2.68$) สำหรับการวัดค่าการหมุนของโมเลกุล (Specific optical rotation) ด้วยเครื่อง Polarimeter พบว่าสาร 4 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ -54° (CHCl_3 ; $c=0.05$) ($[\alpha]_D^{25} = -86^\circ$) (18)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (ν_{max}) : 3437(b), 1689 (s), 1382(m) และ 1046(m) เซนติเมตร⁻¹ (รูปที่23)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) : 0.71, 1.91(2H, m, H-14), 1.02(3H, s, H-19), 1.05(3H, s, H-18), 1.09(3H, s, H-20), 1.12, 1.24(2H, m, H-15), 1.17, 1.40(2H, m, H-7), 1.26, 2.04(2H, m, H-11), 1.31(1H, m, H-5), 1.39, 1.88(2H, m, H-1), 1.43(2H, m, H-6), 1.50, 1.67(2H, m, H-13), 1.83(1H, q, $J=3.2\text{Hz}$, H-12), 2.34, 2.47(2H, m, H-2) และ 3.38, 3.52(2H, q, $J=10.9\text{Hz}$, H-17) ppm (รูปที่24) (ตารางที่23)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 13.47, 19.62, 21.62, 22.94, 23.19, 26.16, 27.15, 32.11, 32.88, 234.05, 37.19, 37.98, 38.71, 47.82, 50.86, 52.44, 55.63, 68.98, 74.08 และ 217.52 ppm (รูปที่25) (ตารางที่24)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 13.47, 21.62, 26.16, 32.11, 50.86 และ 55.63 ppm (รูปที่25) (ตารางที่24)

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) : 19.62, 22.94, 23.19, 27.15, 34.05, 37.98, 38.71, 52.44 และ 68.98 ppm (รูปที่25) (ตารางที่24)

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณ CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 32.11, 50.86 และ 55.63 ppm (รูปที่25) (ตารางที่24)

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมและเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 4 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไคเทอร์ปีน จึงนำสาร 4 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 26 ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ 320(M^+)(1), 302(2), 289(100), 271(11), 107(22), 55(18) และ 43(17) (รูปที่26)

4.3.5. ผลการทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตร โครงสร้าง

สาร 5 มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปเข็ม ได้จากส่วนที่ 215–238 (F_2 ,14) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต (ตารางที่5) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 50:50 อัตราส่วนโดยปริมาตร กรองแยกผลึกออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันสีเหลืองและล้างน้ำมันที่เหลือออกด้วยสารละลายเอทิลเอซิเตต จนกระทั่งได้ผลึกใสรูปเข็มหนัก 0.055 กรัม (0.003% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 197 - 199 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.71 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน) สาร 5 ละลายได้ดีในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์(DMSO) ละลายได้เล็กน้อยใน เอทิลเอซิเตต คลอโรฟอร์ม เอทานอล เมทานอล และไม่ละลายในเฮกเซน และจากการวิเคราะห์สาร 5 ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี เพื่อการดูดกลืนแสงของสาร ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ($\log \epsilon = 5.51$) สำหรับการวัดค่าการหมุนของโมเลกุล (Specific optical rotation) ด้วยเครื่อง Polarimeter พบว่าสาร 5 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ -3° ($CHCl_3$; $c=0.05$)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (ν_{max}) : 3200–3400 (b), 1445(w), 1379(w) และ 1039(m) เซนติเมตร⁻¹(รูปที่27)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) : 0.65(3H,s,H-19), 0.85(3H,s,H-18), 2.48(2H,t,J=1.7Hz,H-17) และ 3.88(1H,s,H-3) ppm (รูปที่ 28) (ตารางที่26)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 18.93, 21.11, 23.35, 28.00, 28.20, 31.83, 32.32, 33.40, 36.74, 37.50, 42.15, 42.49, 43.57, 56.64, 57.81, 60.26, 73.50, 77.88 และ 82.32 ppm (รูปที่29) (ตารางที่27)

DEPT-135 ^{13}C NMR ($CDCl_3$)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 18.93, 21.11, 33.40, 36.74, 56.64, 60.26 และ 82.32 ppm (รูปที่29) (ตารางที่27)

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) : 23.35, 28.00, 28.20, 31.83, 32.32, 42.15, 43.57, 57.81 และ 73.50 ppm (รูปที่29) (ตารางที่27)

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณ CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 18.93, 36.74, 56.64, 60.26 และ 82.32 ppm (รูปที่ 29) (ตารางที่ 27)

นำสาร 5 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 30 ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ $308[\text{M}^+]$ (0.5), 291(100) และ 273(30) (รูปที่ 30)

เนื่องจากสาร 5 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม เพราะบาง ทำให้ไม่สามารถศึกษาโครงสร้างของผลึกโดยวิธีเอกซ์เรย์ได้ ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างจึงต้องใช้เพียงข้อมูลดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

4.3.6. ผลการทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 6 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากส่วนที่ 239–275 (F_2 , 15) และ 258–309 (F_2 , 16) ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต (ตารางที่ 5) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 50:50 อัตราส่วนโดยปริมาตร กรองแยกของแข็งออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันสีเหลือง และล้างน้ำมันที่เหลือออกด้วยสารละลายเอทิลเอซิเตต จนกระทั่งได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวบริสุทธิ์หนัก 0.645 กรัม (0.043% โดยน้ำหนักของแก่นสลัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 206 - 207 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.56 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน) สาร 6 ละลายได้ดีในเอทานอล เมทานอล ละลายได้เล็กน้อยใน เอทิลเอซิเตต คลอโรฟอร์ม และไม่ละลายในเฮกเซน และจากการวิเคราะห์สาร 6 ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี เพื่อดูการดูดกลืนแสงของสาร ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ($\log \epsilon = 4.2$) สำหรับการวัดค่าการหมุนของโมเลกุล (Specific optical rotation) ด้วยเครื่อง Polarimeter พบว่าสาร 6 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ -30° (CHCl_3 ; $c=0.07$) (37)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (ν_{max}) : 3414(s), 2948(w), 1748(s), 1680(m), 1364(s), 1120(m) และ 913(w) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 31)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) : 0.65(3H,s,H-19), 0.72(3H,s,H-18), 0.98(3H,s,H-20), 3.24(1H,dd,J=11.1,4.3Hz,H-17), 3.84(1H,d,J=2.8Hz,H-17'), 4.82(1H,s,H-13) และ 4.97(1H,s,H-3) ppm (รูปที่ 32) (ตารางที่ 29)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 14.04, 15.58, 18.79, 25.24, 26.64, 28.41, 30.76, 36.36, 37.80, 38.76, 43.89, 44.83, 47.39, 51.93, 54.57, 75.09, 78.87, 110.78, 142.71 และ 218.34 ppm (รูปที่ 33) (ตารางที่ 30)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 14.04, 15.58, 28.41, 44.83, 51.93, 54.57, 75.09 และ 78.87 ppm (รูปที่ 33) (ตารางที่ 30)

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) : 18.79, 25.24, 26.64, 30.76, 36.36, 43.89 และ 110.78 ppm (รูปที่ 33) (ตารางที่ 30)

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3)

ปรากฏสัญญาณ CH ที่ค่า chemical shift (δ) : 44.83, 51.93, 54.57, 75.09 และ 78.87 ppm (รูปที่ 33) (ตารางที่ 30)

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมและเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 6 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไดเทอร์ปีน จึงนำสาร 6 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 34 ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ 318 $[\text{M}^+]$ (100), 300(6) และ 285(7) (รูปที่ 34)

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นของต้นสลัดได *Euphorbia antiquorum* Linn. ต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดในงานเพาะเลี้ยง ได้แก่ เซลล์มะเร็งชนิด Hep-G2 (ตับ) SW620(ลำไส้) Chago(ปอด) Kato-3(กระเพาะอาหาร) และ BT474 (เต้านม) แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นสลัดได

สารบริสุทธิ์ ที่แยกได้	% อัตราการรอดของเซลล์มะเร็ง				
	Hep-G2 (ตับ)	SW620 (ลำไส้)	Chago (ปอด)	Kato-3 (กระเพาะ)	BT474 (เต้านม)
1	78	53	74	26	78
2	119	93	98	93	112
3	37	28	35	23	49
4	87	79	76	71	86
5	24	9	7	14	47
6	120	46	67	34	108

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ พบว่า สาร 3 และสาร 5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีทั้ง 5 ชนิด สาร 6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620(ลำไส้) และ Kato-3(กระเพาะ) ได้ดี และสาร 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง Kato-3(กระเพาะ)

จาก % อัตราการรอดของเซลล์มะเร็ง สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีโดยมีอัตราการรอดของเซลล์มะเร็งต่ำกว่า 50% คือสาร 1 สาร3 สาร5 และสาร 6 จะถูกนำไปหาค่า IC_{50} ต่อไป ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด

สารบริสุทธิ์ ที่แยกได้	IC_{50} μ g/ml				
	Hep-G2 (ตับ)	SW620 (ลำไส้)	Chago (ปอด)	Kato-3 (กระเพาะ)	BT474 (เต้านม)
1	7.0	5.2	>10	-2.5	3.7
3	3.3	4.4	7.1	-4.8	4.6
5	2.9	4.1	5.3	-9.5	2.6
6	6.0	8.3	>10	-4.0	4.0

สารที่มีค่า IC_{50} ในระดับที่ยอมรับได้คือสารที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งได้แก่ สาร 5 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Hep-G2 (ตับ) และเซลล์มะเร็ง BT474 (เต้านม) ได้ดีที่ค่า IC_{50} 2.9 และ 2.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ในสิ่งสกัดเฮกเซนและเอทิลเอซิติเตตจากแก่นสลัดได

5.1.1. ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซนซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิติเตต 50:50, 80:20 และ 90:10 อัตราส่วนโดยปริมาตร มีลักษณะเป็นแผ่นผลึกสีขาววาวหนัก 1.265 กรัม (0.084% โดยน้ำหนักของแก่นสลัดไดแห้ง) จุดหลอมเหลว 145 - 146 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.30 (ซิลิกาเจล :50% เอทิลเอซิติเตตในเฮกเซน)

จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่11) ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 1700, 1660 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่คาร์บอนิล ที่ 1648 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่อัลคีนและหมู่โอลิฟินิก แถบการดูดกลืนแสงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1

แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
2962 – 2933	สูง	C-H สั่นแบบยืดอย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₂
2892 – 2866	สูง	C-H สั่นแบบยืดอย่างสมมาตรของหมู่ CH ₂
1700 , 1660	สูง, ปานกลาง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1648	ปานกลาง, สูง	C=C สั่นแบบยืดของหมู่อัลคีนและหมู่โอลิฟินิก
1453	สูง	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₃
1430	สูง	C-H สั่นแบบงอในระบบของหมู่ CH ₂
1390 , 1380	สูง, สูง	C-H สั่นแบบงอในระบบอย่างสมมาตรของหมู่ CH ₃

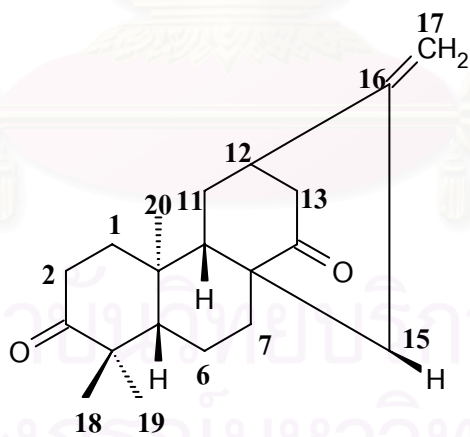
จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 (รูปที่12) (ตารางที่9) ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิล (CH₃) ที่ค่า chemical shift (δ) : 0.84, 0.98 และ 1.05 ppm (3H,s, H-20, H-19 และ H-18

ตามลำดับ) สัญญาณที่ 4.64 ppm (1H,d,J=1.3Hz,H-17) และ 4.87 ppm (1H,d,J=1.0Hz,H-17') แสดงลักษณะของหมู่โพลิฟีนิก (C=CH₂)

จากข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 (รูปที่13) (ตารางที่10) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ และจาก DEPT-135 (รูปที่13) และ DEPT-90 (รูปที่13) ทำให้ทราบว่า มีหมู่ CH₃ 3 หมู่ คือที่ค่า chemical shift (δ) : 25.95, 21.82 และ 12.75 ppm มีหมู่ CH₂ 8 หมู่ คือที่ 20.00, 27.85, 31.16, 31.08, 37.16, 42.59, 44.54 และ 107.14 ppm (แสดงลักษณะของหมู่โพลิฟีนิก) มีหมู่ CH 3 หมู่ คือที่ 38.32, 51.82 และ 55.30 ppm ส่วนที่เหลือเป็นควอเตอร์เนรีคาร์บอน 4 อะตอม คือที่ 37.59, 47.60, 47.67 และ 147.05 ppm และคาร์บอนิลคาร์บอนที่ 216.39 และ 216.50 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่14) พบไอออนเชิงโมเลกุลที่ 300 ดังนั้นสูตรโมเลกุลคือ C₂₀H₂₈O₂ (จากการคำนวณได้ C 80.00%, H 9.33%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 7

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดที่กล่าวมาพบว่า สาร 1 แสดงข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม เหมือนกับสาร ent-Atis-16-ene-3,14-dione (19) ดังตารางที่ 9 และ 10 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสาร 1 คือ สาร ent-Atis-16-ene-3,14-dione ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Allick R.Lal และคณะ เมื่อปี ค.ศ.1990 จากแก่นของต้น *Euphorbia fidijaina* (19)



รูปที่ 2 โครงสร้างของสาร 1 หรือสาร ent-Atis-16-ene-3,14-dione

ตารางที่ 9 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับสาร ent-Atis-16-ene-3, 14-dione

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 1	ent-Atis-16-ene-3,14-dione
H-1 β	1.81(m) -	1.84(ddd) $J = 13.4, 6.3, 3.1$
H-1 α	1.33(m) -	1.37(ddd) $J = 13.4, 13.2, 4.7$
H-2 β	2.46(ddd) $J = 27.3, 13.6, 4.5$	2.57(ddd) $J = 15.8, 13.2, 6.3$
H-2 α	2.35 (m)	2.34(m)
H-5	1.22(dd) $J = 11.8, 2.4$	1.29(dd) $J = 12.4, 2.5$
H-6 β	1.65(m)	1.65(m)
H-6 α	1.58(m)	1.52(m)
H-7 β	2.35(m)	2.35(m)
H-7 α	0.90(m)	0.92(m)
H-9	1.66(m)	1.65(m)
H-11 β	1.66(m)	1.66(m)
H-11 α	1.95(br t)	1.95(br dt)
H-12	2.68(t) $J = 2.8$	2.73(ddd) $J = 2.5, 3.7, 3.0, 3.0$
H-13, 13'	2.33(m), 2.31(m)	2.32(m), 2.32(m)
H-15, 15'	2.30(m), 2.36(m)	2.30(m), 2.34(m)
H-17	4.64(d) $J = 1.3$	4.69(dt) $J = 2.1, 1.1$
H-17'	4.86(d) $J = 1.0$	4.90(dt) $J = 2.4, 1.1$
18 α -Me	1.05(s)	1.09(s)
19 β -Me	0.98(s)	1.02(s)
20 β -Me	0.84(s)	0.88(s)

ตารางที่ 10 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับสาร ent-Atis-16-ene-3, 14-dione

ตำแหน่ง คาร์บอน	ค่า chemical shift (ppm)	
	สาร 1	ent-Atis-16-ene-3,14-dione
1	37.16(t)	37.20(t)
2	34.08(t)	34.10(t)
3	216.39(s)	216.50(s)
4	47.60(s)	47.60(s)
5	55.30(d)	55.30(d)
6	20.00(t)	20.00(t)
7	31.16(t)	31.20(t)
8	47.67(s)	47.70(s)
9	51.82(d)	51.80(d)
10	37.59(s)	37.60(s)
11	27.85(t)	27.90(t)
12	38.32(d)	38.30(d)
13	44.54(t)	44.60(t)
14	216.50(s)	216.60(s)
15	42.59(t)	42.60(t)
16	147.50(s)	147.10(s)
17	107.14(t)	107.20(t)
18	25.95(q)	26.00(q)
19	21.82(q)	21.90(q)
20	12.75(q)	12.80(q)

5.1.2. ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 2

สาร 2 ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซนซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลเอซิเตตกับเมทานอล 75:25 อัตราส่วนโดยปริมาตร และจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 90:10, 80:20 และ 75:25 อัตราส่วนโดยปริมาตร มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปแท่งหนัก 2.506 กรัม (0.167% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 162 - 163 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 (ซิลิกาเจล :25% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน)

จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่15) ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 3437, 1076 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่ 1726, 1690 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่คาร์บอนิล (C=O) และที่ 909 เซนติเมตร⁻¹ แสดง 1,1-disubstituted double bond ของหมู่โอลิฟินิก (C=CH₂) แถบการดูดกลืนแสงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2

แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3437, 1076	สูง, ปานกลาง	-OH สั่นแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซิล
2925, 2851	ปานกลาง ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดหมู่ CH ₂ , CH ₃
1726, 1690	สูง สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1453	ต่ำ	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₃
1382	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₂
909	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างออกนอกระนาบของหมู่โอลิฟินิก

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 (รูปที่16) (ตารางที่17) ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิล (CH₃) ที่ค่า chemical shift (δ) : 0.82, 0.98 และ 1.06 ppm (3H,s, H-20, H-18 และ H-10 ตามลำดับ) สัญญาณที่ 4.83 ppm (1H,s,H-17') และ 4.99 ppm (1H,s,H-17) แสดงลักษณะของหมู่โอลิฟินิก (C=CH₂) และสัญญาณที่ 3.85 ppm (1H,d,J=2.8Hz,H-13) แสดงลักษณะของ secondary alcohol (CH-OH)

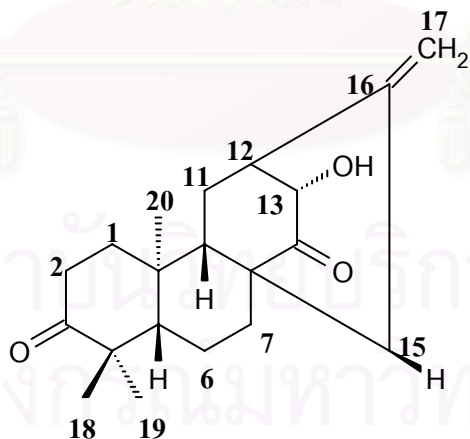
จากข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 (รูปที่17) (ตารางที่18) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ และจาก DEPT-135 (รูปที่17) และ DEPT-90 (รูปที่17) ทำให้ทราบว่าหมู่ CH₃ 3 หมู่ คือที่ค่า chemical shift (δ) : 13.65, 21.85 และ 26.13 ppm มีหมู่ CH₂ 7 หมู่ คือที่ 19.91, 25.31, 30.36, 34.05, 36.66, 43.62 และ 111.05 ppm (แสดงลักษณะของหมู่โอลิฟินิก) มี

หมู่ CH 4 หมู่ คือที่ 44.77, 51.04, 55.08 และ 75.05 ppm ส่วนที่เหลือเป็นควอเตอร์เนรีคาร์บอน 4 อะตอม คือที่ 37.51, 47.27, 47.46 และ 142.27 ppm และคาร์บอนิลคาร์บอนที่ 216.14 และ 218.06 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่ 18) พบไอออนเชิงโมเลกุลที่ 316 ดังนั้นสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{28}O_3$ (จากการคำนวณได้ C 75.95%, H 8.86%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 7

สาร 2 มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปแท่งจึงทำการศึกษาโครงสร้างผลึกโดยวิธีเอกซ์-เรย์ ได้ข้อมูลดังตารางที่ 12, 13, 14, 15 และ 16 ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์สามารถวาดโครงสร้างผลึกได้ดังรูปที่ 4 และรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างหลักมีลักษณะเป็น atisine diterpene วง A และ B มีรูปร่างแบบเก้าอี้ (chair conformation) และเชื่อมต่อกันแบบ trans-fused มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ซึ่งเป็นหมู่เมทิลมีการจัดเรียงตัวแบบ α -orientation และไฮโดรเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มีการจัดเรียงตัวแบบ β -orientation วง C มีรูปร่างแบบ twist-boat conformation และวง D มีรูปร่างแบบเรือ (boat conformation) ตามลำดับ

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและข้อมูลโครงสร้างผลึกทั้งหมดที่กล่าวมาโดยเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ สเปกตรัมได้ดังตารางที่ 17 และ 18 พบว่าสาร 2 คือสาร Antiquorin (22) หรือสาร ent-(13s)-Hydroxyatis-16-ene-3,4-dione ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Min Zhi-da และคณะ เมื่อปี ค.ศ.1989 จากต้นสลัดไดเช่นเดียวกัน (5)



รูปที่ 3 โครงสร้างของสาร 2 หรือสาร Antiquorin

ตารางที่ 12 ข้อมูลโครงสร้างผลึกของสาร 2

Empirical formula	$C_{20}H_{28}O_3$
Formula weight	316.42
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	orthorhombic, P212121
Unit cell dimensions	a = 7.3663(2) Å alpha = 90 deg b = 12.5897(4) Å beta = 90 deg c = 18.3980(6) Å gamma = 90 deg
Volume	1706.22(9) Å ³
Z, Calculated density	4, 1.232 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.081 mm ⁻¹
F(000)	688
Crystal size	0.50 x 0.40 x 0.40 mm.
Theta range for data collection	1.96 to 30.43 deg
Limiting indices	$-9 \leq h \leq 10, -17 \leq k \leq 15, -23 \leq l \leq 26$
Reflections collected / unique	12701 / 4895 [R(int) = 0.0141]
Completeness to theta = 30.43	97.0%
Max. and Min. transmission	0.9684 and 0.9607
Refinement method	Full-metricx least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4895 / 0 / 287
Goodness-of-fit on F ²	1.062
Final R indices [I > 2 sigma(I)]	R1 = 0.0329, wR2 = 0.0901
R indices (all data)	R1 = 0.0365, wR = 0.0931
Absolute structure parameter	0.1 (8)
Largest diff. Peak and hold	0.200 and -0.145 e.Å ⁻³

ตารางที่ 13 Atomic coordinates ($\times 10^4$) และ equivalent isotropic displacement parameters ($\text{Å}^2 \times 10^3$)

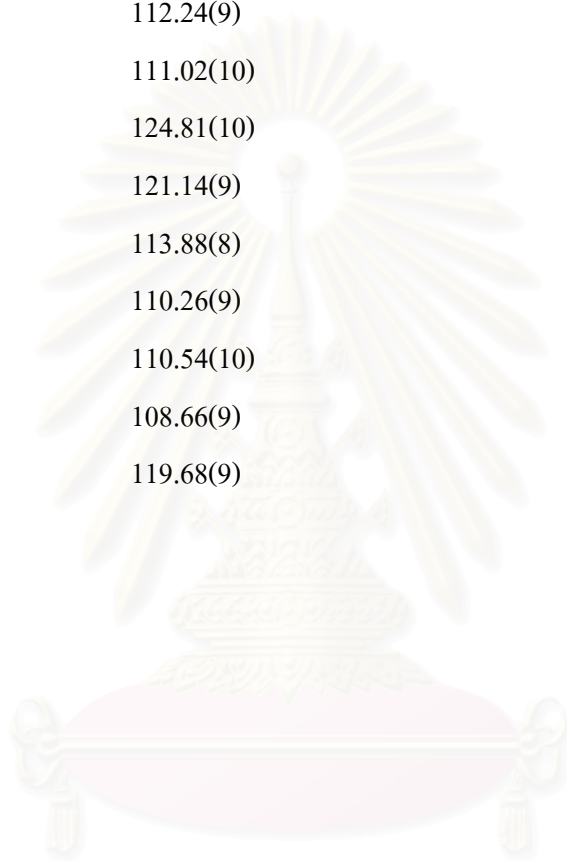
ข้อสงสาร 2

position	x	y	z	U (eq)
C(20)	3277(1)	-22(1)	1331(1)	37(1)
O(2)	284(1)	-1729(1)	-654(1)	53(1)
C(21)	3241(4)	4902(1)	1749(1)	73(1)
C(1)	2868(2)	515(1)	18(1)	37(1)
C(2)	2707(2)	-623(1)	-274(1)	43(1)
C(3)	836(2)	-1096(1)	-204(1)	36(1)
C(4)	-326(2)	-839(1)	466(1)	36(1)
C(5)	92(1)	293(1)	779(1)	28(1)
C(6)	-830(1)	493(1)	1516(1)	37(1)
C(7)	-799(1)	1674(1)	1706(1)	39(1)
C(8)	1110(1)	2143(1)	1699(1)	31(1)
C(9)	2158(1)	1850(1)	990(1)	29(1)
C(10)	2123(1)	640(1)	798(1)	27(1)
C(11)	4100(2)	2354(1)	1009(1)	40(1)
C(12)	4377(2)	3025(1)	1705(1)	42(1)
C(13)	2918(2)	3860(1)	1735(1)	48(1)
C(14)	1023(2)	3381(1)	1738(1)	46(1)
C(15)	2226(2)	1839(1)	2364(1)	32(1)
C(16)	4174(2)	2282(1)	2357(1)	40(1)
C(18)	-2338(2)	-878(1)	229(1)	58(1)
C(19)	15(2)	-1759(1)	1011(1)	55(1)
O(1)	1647(1)	1354(1)	2884(1)	49(1)
O(4)	4545(2)	2836(1)	3010(1)	62(1)

ตารางที่ 14 ความยาวพันธะ (Bond length; Å) และมุม (Angle; deg) ของโครงสร้างผลึกสาร 2

C(20)-C(10)	1.5430(13)	C(2)-C(1)-C(10)	113.18(9)
O(2)-C(3)	1.2189(13)	C(3)-C(2)-C(1)	114.17(9)
C(21)-C(13)	1.3329(16)	O(2)-C(3)-C(2)	120.42(10)
C(1)-C(2)	1.5344(15)	O(2)-C(3)-C(4)	119.76(10)
C(1)-C(10)	1.5430(12)	C(3)-C(4)-C(18)	107.49(9)
C(2)-C(3)	1.5066(17)	C(3)-C(4)-C(19)	105.73(9)
C(3)-C(4)	1.5363(13)	C(18)-C(4)-C(19)	108.30(11)
C(4)-C(18)	1.5459(17)	C(3)-C(4)-C(5)	112.10(8)
C(4)-C(19)	1.5521(17)	C(18)-C(4)-C(5)	108.72(9)
C(4)-C(5)	1.5669(13)	C(19)-C(4)-C(5)	114.24(9)
C(5)-C(6)	1.5375(13)	C(6)-C(5)-C(10)	110.99(7)
C(5)-C(10)	1.5591(12)	C(6)-C(5)-C(4)	112.69(8)
C(6)-C(7)	1.5273(15)	C(10)-C(5)-C(4)	116.84(7)
C(7)-C(8)	1.5250(15)	C(7)-C(6)-C(5)	110.79(9)
C(8)-C(15)	1.5233(13)	C(8)-C(7)-C(6)	112.90(8)
C(8)-C(9)	1.5601(13)	C(15)-C(8)-C(7)	113.17(8)
C(8)-C(14)	1.5608(14)	C(15)-C(8)-C(9)	110.18(8)
C(9)-C(10)	1.5645(13)	C(7)-C(8)-C(9)	111.82(7)
C(9)-C(11)	1.5650(14)	C(15)-C(8)-C(14)	103.62(8)
C(11)-C(12)	1.5483(16)	C(7)-C(8)-C(14)	110.40(9)
C(12)-C(13)	1.5040(2)	C(9)-C(8)-C(14)	107.18(8)
C(12)-C(16)	1.5275(15)	C(8)-C(9)-C(10)	114.29(7)
C(13)-C(14)	1.5200(2)	C(8)-C(9)-C(11)	109.73(7)
C(15)-O(1)	1.2129(13)	C(10)-C(9)-C(11)	114.52(8)
C(15)-C(16)	1.5395(15)	C(1)-C(10)-C(20)	109.92(8)
C(16)-O(4)	1.4163(14)	C(1)-C(10)-C(5)	106.95(7)
		C(20)-C(10)-C(5)	113.06(8)
		C(1)-C(10)-C(9)	107.66(7)
		C(20)-C(10)-C(9)	111.91(8)

C(5)-C(10)-C(9)	107.07(7)
C(12)-C(11)-C(9)	111.11(9)
C(13)-C(12)-C(16)	109.22(10)
C(13)-C(12)-C(11)	108.52(10)
C(16)-C(12)-C(11)	107.59(9)
C(21)-C(13)-C(12)	124.08(17)
C(12)-C(13)-C(14)	112.24(9)
C(13)C(14)-C(8)	111.02(10)
O(1)-C(15)-C(8)	124.81(10)
O(1)-C(15)-C(16)	121.14(9)
C(8)-C(15)-C(16)	113.88(8)
O(4)-C(16)-C(12)	110.26(9)
O(4)-C(16)-C(15)	110.54(10)
C(12)-C(16)-C(15)	108.66(9)
C(2)-C(3)-C(4)	119.68(9)



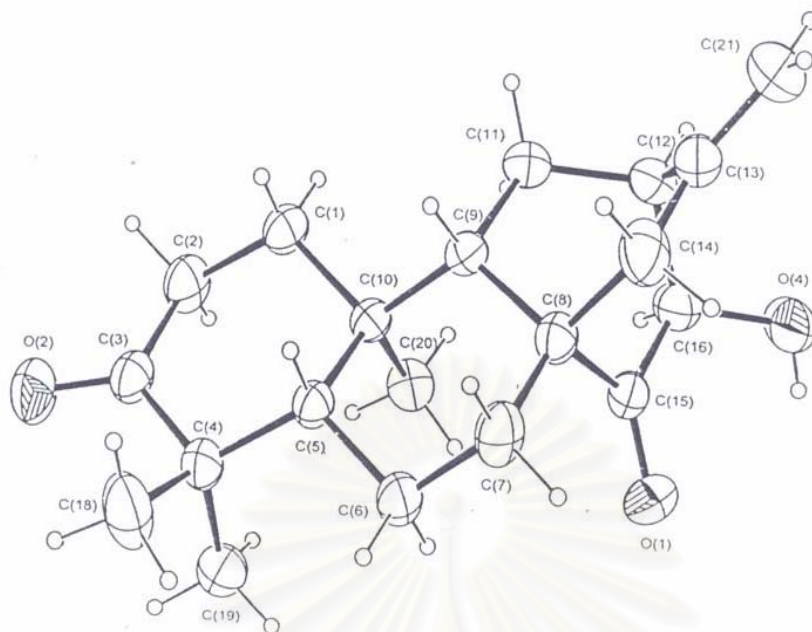
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 Anisotropic displacement parameters ($\text{Å}^2 \times 10^3$) ของสาร 2

position	U11	U22	U33	U23	U13	U12
C(20)	36(1)	34(1)	40(1)	1(1)	-5(1)	5(1)
O(2)	64(1)	54(1)	41(1)	-20(1)	4(1)	-5(1)
C(21)	129(1)	34(1)	56(1)	0(1)	9(1)	-16(1)
C(1)	37(1)	44(1)	30(1)	-6(1)	10(1)	-3(1)
C(2)	43(1)	49(1)	38(1)	-14(1)	10(1)	2(1)
C(3)	44(1)	33(1)	29(1)	-5(1)	1(1)	4(1)
C(4)	38(1)	37(1)	31(1)	-8(1)	4(1)	-6(1)
C(5)	28(1)	31(1)	26(1)	-4(1)	2(1)	-1(1)
C(6)	31(1)	45(1)	35(1)	-10(1)	9(1)	-7(1)
C(7)	32(1)	47(1)	39(1)	-14(1)	4(1)	5(1)
C(8)	34(1)	30(1)	28(1)	-3(1)	0(1)	3(1)
C(9)	34(1)	29(1)	24(1)	1(1)	1(1)	-1(1)
C(10)	27(1)	29(1)	24(1)	-2(1)	4(1)	1(1)
C(11)	44(1)	42(1)	34(1)	0(1)	6(1)	-14(1)
C(12)	53(1)	39(1)	35(1)	3(1)	-1(1)	-19(1)
C(13)	81(1)	31(1)	30(1)	2(1)	-2(1)	-9(1)
C(14)	65(1)	31(1)	42(1)	-4(1)	-7(1)	10(1)
C(15)	42(1)	30(1)	26(1)	-2(1)	-1(1)	-2(1)
C(16)	46(1)	39(1)	35(1)	4(1)	-9(1)	-10(1)
C(18)	40(1)	72(1)	62(1)	-29(1)	3(1)	-13(1)
C(19)	90(1)	36(1)	41(1)	0(1)	6(1)	-17(1)
O(1)	62(1)	55(1)	30(1)	6(1)	4(1)	-13(1)
O(4)	92(1)	57(1)	37(1)	7(1)	-22(1)	-34(1)

ตารางที่ 16 Hydrogen bonds ของสาร 2 (Å° และ deg.)

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
O(4)-H(60)...O(2)#1	0.82(2)	2.04(2)	2.8278(12)	161(2)



รูปที่ 4 ORTEP Drawing ของสาร 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 The packing diagram ของสาร 2

ตารางที่ 17 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 เปรียบเทียบกับสาร Antiquorin

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 2	Antiquorin
H-1 β	1.41(ddd) <i>J</i> = 20.14, 12.91, 4.35	1.39(ddd) <i>J</i> = 12.2, 11.7, 5.4
H-1 α	1.81(m) -	1.88(ddd) <i>J</i> = 12.2, 5.4, 3.2
H-2 α	2.56(ddd) <i>J</i> = 15.84, 6.33, 2.65	2.56(ddd) <i>J</i> = 14.3, 11.7, 5.4
H-2 β	2.32 (m) -	2.38(ddd) <i>J</i> = 14.3, 3.2, 5.4
H-5 α	1.28(dd) <i>J</i> = 13.43, 6.95	1.35(dd) <i>J</i> = 9.7, 3.4
H-6 α	1.54(m)	1.56(m)
H-6 β	1.53(m)	1.52(m)
H-7 α	0.90(m) -	1.00(ddd) <i>J</i> = 11.0, 10.0, 3.0
H-7 β	2.40(dd) <i>J</i> = 4.90, 3.26	2.44(ddd) <i>J</i> = 11.0, 3.0, 3.0
H-9 α	1.58(dd) <i>J</i> = 11.02, 6.01	1.68(dd) <i>J</i> = 10.5, 5.4
H-11 α	1.97(ddd) <i>J</i> = 13.26, 3.61, 3.61	2.02(ddd) <i>J</i> = 12.5, 10.5, 2.6
H-11 β	1.73(m) -	1.75(ddd) <i>J</i> = 12.5, 5.4, 2.6
H-12 α	2.76(dd) <i>J</i> = 5.87, 2.89	2.82(ddd) <i>J</i> = 3.0, 2.6, 2.6
H-13 β	3.85(d) <i>J</i> = 2.84	3.88(d) <i>J</i> = 3.0
H-15	2.29(m)	2.30(m)
H-17, 17'	4.99(m), 4.83(m)	5.01(m), 4.85(m)

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 2	Antiquorin
18-Me	0.98(s)	1.01(s)
19-Me	1.06(s)	1.10(s)
20-Me	0.82(s)	0.84(s)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 เปรียบเทียบกับสาร Antiquorin

ตำแหน่ง คาร์บอน	ค่า chemical shift (ppm)	
	สาร 2	Antiquorin
1	36.66(t)	36.70(t)
2	34.05(t)	34.07(t)
3	216.14(s)	216.00(s)
4	47.46(s)	47.50(s)
5	55.08(d)	55.15(d)
6	19.91(t)	19.95(t)
7	30.36(t)	30.39(t)
8	47.27(s)	47.31(s)
9	51.04(d)	51.50(d)
10	37.51(s)	37.56(s)
11	25.31(t)	25.35(t)
12	44.77(d)	44.80(d)
13	75.05(d)	75.15(d)
14	218.06(s)	218.00(s)
15	43.76(t)	43.71(t)
16	142.27(s)	142.30(s)
17	111.05(t)	111.10(t)
18	26.13(q)	26.17(q)
19	21.85(q)	21.98(q)
20	13.65(q)	13.71(q)

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของสาร 1 และสาร 2 แล้ว พบว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 14 ของสาร 2 เป็นตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ต่างกับของสาร 1 ที่เป็นตำแหน่งของหมู่เมทิลีน (CH₂) ดังนั้นสาร 1 อาจมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งได้ว่า Deoxyantiquorin

5.1.3. ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 3

สาร 3 ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซนซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลเอซิเตตกับเมทานอล 60:40, 50:50 และ 40:60 อัตราส่วนโดยปริมาตร และจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 75:25 อัตราส่วนโดยปริมาตร มีลักษณะเป็นของแข็งอัสฐานสีขาวหนัก 0.941 กรัม (0.062% โดยน้ำหนักของแก่นสลัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 222 - 223 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.43 (ซิลิกาเจล : 25% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน)

จากอินฟราเรดสเปกตรัม(รูปที่19) ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 3006 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ 1762 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่แลคโตนคาร์บอนิล (C=O) และที่ 1677, 1654 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่แอลคีน (C=C) แถบการดูดกลืนแสงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3

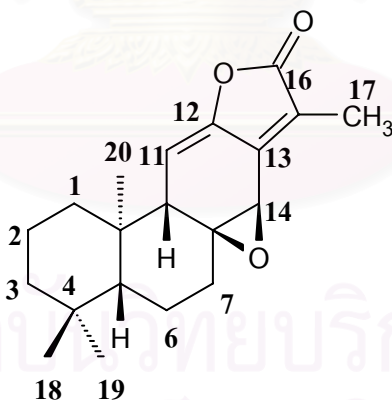
แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3006	ต่ำ	C-C สั่นแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซิล
2921	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดอย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₂
2865	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดอย่างสมมาตรของหมู่ CH ₂
1762	สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่แลคโตนคาร์บอนิล
1677, 1654	ต่ำ, ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืดของหมู่แอลคีน
1442	ต่ำ	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₃
1390	ต่ำ	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₃
1221	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืดของหมู่เอสเตอร์คาร์บอนิล
845	ปานกลาง	C=C สั่นแบบงออย่างออกนอกระนาบของหมู่แอลคีน

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 (รูปที่20) (ตารางที่20) ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิล (CH₃) ที่ค่า chemical shift (δ) : 0.70, 0.84, 0.93 และ 2.04 ppm (3H,s, H-20, H-19, H-18 และ H-17 ตามลำดับ) , สัญญาณที่ 3.69 ppm (1H,s,H-14) แสดงลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล และสัญญาณที่ 5.43 ppm (1H,d,J=5.3Hz,H-11) แสดงลักษณะของหมู่แอลคีน

จากข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 (รูปที่20) (ตารางที่21) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ และจาก DEPT-135 (รูปที่20) และ DEPT-90 (รูปที่20) ทำให้ทราบว่ามีหมู่ CH_3 4 หมู่ คือที่ค่า chemical shift (δ) : 8.67 (แสดงลักษณะของหมู่ vinyl methyl), 15.00, 21.92 และ 33.50 ppm มีหมู่ CH_2 5 หมู่ คือที่ 18.44, 20.67, 34.14, 39.67 และ 41.50 ppm มีหมู่ CH 4 หมู่ คือที่ 51.63, 53.49, 54.47 ppm (แสดงลักษณะของหมู่เอพอกไซด์) และ 104.10 ppm (แสดงลักษณะของหมู่อัลคีน) มีควอเตอร์นารีคาร์บอน 3 อะตอม คือที่ 33.50, 41.50 และ 61.18 ppm และหมู่อัลคีน ($\text{C}=\text{C}$) 3 หมู่ คือที่ 125.19, 145.03 และ 147.46 และที่เหลืออีกหนึ่งหมู่คือแลคโตนคาร์บอนิลที่ 170.62 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่22) พบไอออนเชิงโมเลกุลที่ 314 ดังนั้นสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$ (จากการคำนวณได้ C 76.43%, H 8.28%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 8

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี ทั้งหมดที่กล่าวมาพบว่าสาร 3 แสดงข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมตรงกับสาร Jolkinolide A (19) หรือ สาร ent-8 α ,14 α -Epoxyabieta-11,13(15)-dien-16,12-olide ดังตารางที่ 20 และ 21 จึงให้เห็นว่าสาร 3 คือสาร Jolkinolide A ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Daizuke Uemura และ Yoshimasa Hirata เมื่อปีค.ศ. 1972 จากรากของต้น *Euphorbia jolkini* Boiss. (44)



รูปที่ 6 โครงสร้างของสาร 3 หรือสาร Jolkinolide A

ตารางที่ 20 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 เปรียบเทียบกับสาร Jolkinolide A

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 3	Jolkinolide A
H-1 β	1.83(m)	1.85(m)
H-1 α	1.36(m)	1.38(m)
H-2 β	2.29(m)	2.30(m)
H-2 α	2.09(m)	2.11(m)
H-3	1.20(m)	1.23(m)
H-5	3.47(s)	3.49(m)
H-6 β	1.64(m)	1.65(m)
H-6 α	1.51(m)	1.52(m)
H-7 β	1.61(m)	1.63(ddd)
	-	$J = 2.1, 4.4, 13.8$
H-7 α	2.12(m)	2.13(dt)
	-	$J = 5.5, 5.5, 13.8$
H-9	2.60(d)	2.64(d)
	$J = 5.3$	$J = 5.4$
H-11	5.43(d)	5.47(d)
	$J = 5.3$	$J = 5.4$
H-14	3.69(s)	3.72(s)
17-Me	2.04(s)	2.07(s)
18 α -Me	0.93(s)	0.95(s)
19 β -Me	0.84(s)	0.86(s)
20 β -Me	0.70(s)	0.73(s)

ตารางที่ 21 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 เปรียบเทียบกับสาร Jolkinolide A

ตำแหน่ง คาร์บอน	ค่า chemical shift (ppm)	
	สาร 3	Jolkinolide A
1	39.67(t)	39.90(t)
2	18.44(t)	18.50(t)
3	41.50(t)	41.50(t)
4	33.50(s)	33.50(s)
5	53.49(d)	53.50(d)
6	20.67(t)	20.90(t)
7	34.14(t)	34.20(t)
8	61.18(s)	61.20(s)
9	51.63(d)	51.90(d)
10	41.50(s)	41.50(s)
11	104.10(d)	104.10(d)
12	147.46(s)	147.50(s)
13	145.03(s)	145.10(s)
14	54.47(d)	54.50(d)
15	125.19(s)	125.20(s)
16	170.62(s)	170.70(s)
17	8.67(q)	8.70(q)
18	33.50(q)	33.50(q)
19	21.92(q)	21.90(q)
20	15.00(q)	15.00(q)

5.1.4. ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 4

สาร 4 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 60:40 อัตราส่วนโดยปริมาตร มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.230 กรัม (0.015% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 165 - 166 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.76 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน)

จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่23) ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 3437-3355 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล(OH) และที่ 1689 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่คาร์บอนิล (C=O) แถบการดูดกลืนแสงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4

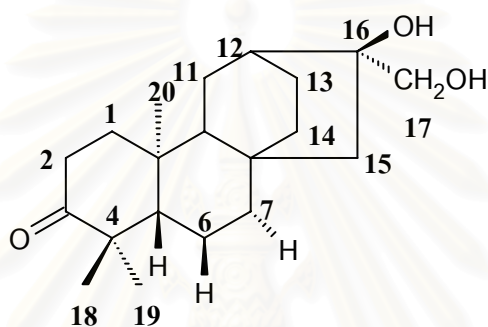
แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3437-3355	Broad	OH สั่นแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซิล
2933	สูง	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₂
2859	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₂
1689	สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1382	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₃
1046	ปานกลาง	C-OH สั่นแบบยืดของหมู่แอลกอฮอล์

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 (รูปที่24) (ตารางที่23) ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิล (CH₃) ที่ค่า chemical shift (δ) : 1.02, 1.05 และ 1.09 ppm (3H,s, H-19, H-18 และ H-20 ตามลำดับ), สัญญาณที่ 3.38 และ 3.52 ppm (2H,q,J=10.9Hz) แสดงลักษณะของหมู่ primary alcohol (R-CH₂-OH)

จากข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 (รูปที่25) (ตารางที่24) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ และจาก DEPT-135 (รูปที่25) และ DEPT-90 (รูปที่25) ทำให้ทราบว่า มีหมู่ CH₃ 3 หมู่ คือที่ค่า chemical shift (δ) : 13.47, 21.62 และ 26.16 ppm มีหมู่ CH₂ 9 หมู่ คือที่ 19.62, 22.94, 23.19, 27.15, 34.05, 37.98, 38.71, 52.44 และ 68.98 ppm มีหมู่ CH 3 หมู่ คือที่ 32.11, 50.86 และ 55.63 ppm มีควอเตอร์นารีคาร์บอน 4 อะตอม คือที่ 32.88, 37.19, 47.82 และ 74.08 และที่เหลืออีกหนึ่งหมู่คือคาร์บอนิลคาร์บอนที่ 217.51 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่26) พบไอออนเชิงโมเลกุลที่ 320 ดังนั้นสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{32}O_3$ (จากการคำนวณได้ C 75.00%, H 10.00%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 5

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี ทั้งหมดที่กล่าวมาพบว่าสาร 4 แสดงข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมตรงกับสาร ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one(18) ดังตารางที่ 23 และ24 ซึ่งให้เห็นว่าสาร 4 คือสารent-16 α ,17- Dihydroxy atisan-3-one ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Allick R.Lal และคณะ เมื่อปีค.ศ. 1990 จากแก่นของต้น *Euphorbia fidjiana* (18)



รูปที่ 7 โครงสร้างของสาร 4 หรือสาร ent-16 α ,17- Dihydroxyatisan-3-one

ตารางที่ 23 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 เปรียบเทียบกับสาร ent-16 α ,17- Dihydroxyatisan-3-one

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 4	ent-16 α ,17- Dihydroxyatisan-3-one
H-1 β	1.88(m)	1.85(m)
H-1 α	1.39(m)	1.38(m)
H-2 β	2.47(m)	2.58(ddd)
	-	$J = 6.9, 12.3, 16.0$
H-2 α	2.34(m)	2.33(ddd)
	-	$J = 3.2, 6.0, 16.0$
H-5	1.31(m)	1.30(m)
H-6 β	1.43(m)	1.45(m)
H-6 α	1.43(m)	1.45(m)
H-7 β	1.40(m)	1.42(m)
H-7 α	1.17(m)	1.18(m)
H-9	1.34(m)	1.32(m)
H-11 β	1.26(m)	1.24(m)
H-11 α	2.04(m)	2.03(m)
H-12	1.83(qn)	1.82(qn)
	$J = 3.2$	$J = 3.0$
H-13	1.50(m)	1.50(m)
H-13'	1.67(m)	1.63(m)
H-14	0.71(m)	0.82(m)
H-14'	1.91(m)	1.87(m)
H-15	1.12(m)	1.10(m)
H-15'	1.24(m)	1.24(m)
H-17, 17'	3.38, 3.52 (Abq)	3.43, 3.57 (Abq)
	$J = 10.95$	$J = 10.9$
18-Me	1.05(s)	1.07(s)
19-Me	1.02(s)	1.04(s)
20-Me	1.09(s)	1.11(s)

ตารางที่ 24 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 เปรียบเทียบกับสาร ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one

ตำแหน่ง คาร์บอน	ค่า chemical shift (ppm)	
	สาร4	ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one
1	37.98(t)	38.00(t)
2	34.05(t)	34.00(t)
3	217.51(s)	217.50(s)
4	47.82(s)	47.60(s)
5	55.63(d)	55.60(d)
6	19.62(t)	19.60(t)
7	38.71(t)	38.70(t)
8	32.88(s)	32.80(s)
9	50.86(d)	50.80(d)
10	37.19(s)	37.20(s)
11	22.94(t)	22.90(t)
12	32.11(d)	32.10(d)
13	23.19(t)	23.20(t)
14	27.15(t)	27.20(t)
15	52.44(t)	52.40(t)
16	74.08(s)	74.10(s)
17	68.98(t)	68.90(t)
18	26.16(q)	26.10(q)
19	21.62(q)	21.60(q)
20	13.47(q)	13.40(q)

5.1.5. ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 5

สาร 5 ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 50:50 อัตราส่วนโดยปริมาตร มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปเข็มหนัก 0.055 กรัม (0.003% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 197 - 199 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.71 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน)

จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่27) ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 3200-3400 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล(OH) และที่ 1039 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ primary alcohol แถบการดูดกลืนแสงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5

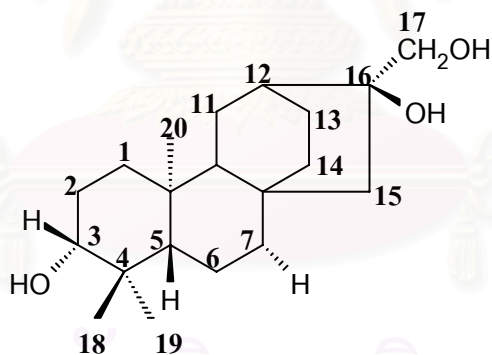
แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3200-3400	Broad	OH สั่นแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซิล
2933	สูง	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH_2
2874	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH_2
1445	ต่ำ	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH_3
1379	ต่ำ	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH_3
1039	ปานกลาง	C-OH สั่นแบบยืดของหมู่แอลกอฮอล์

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 (รูปที่28) (ตารางที่26) ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิล (CH_3) ที่ค่า chemical shift (δ) : 0.65 และ 0.85 ppm (3H,s, H-19 และ H-18 ตามลำดับ) สัญญาณที่ 2.48 ppm (2H,t,J=1.7Hz) แสดงลักษณะของหมู่ primary alcohol ($\text{R}-\text{CH}_2-\text{OH}$) และสัญญาณที่ 3.88 ppm (1H,s,H-3) แสดงลักษณะของหมู่ secondary alcohol ($\text{CH}-\text{OH}$)

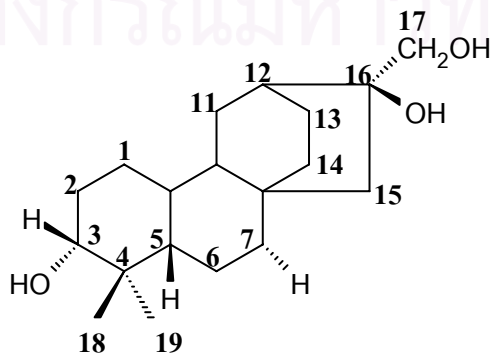
จากข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 (รูปที่29) (ตารางที่27) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 19 สัญญาณ และจาก DEPT-135 (รูปที่29) และ DEPT-90 (รูปที่29) ทำให้ทราบว่า มีหมู่ CH_3 2 หมู่ คือที่ค่า chemical shift (δ) : 21.11 และ 33.40 ppm มีหมู่ CH_2 9 หมู่ คือที่ 23.35, 28.00, 28.20, 31.83, 32.32, 42.15, 43.57, 57.81 และ 73.50 ppm มีหมู่ CH 5 หมู่ คือที่ 18.93, 36.74, 56.64, 60.26 และ 82.32 ppm ที่เหลือเป็นควอเตอร์เนรีคาร์บอน 3 อะตอม คือที่ 37.50, 42.49 และ 77.88 ppm

และจากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่30) พบไอออนเชิงโมเลกุลที่ 308 ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่น่าจะเป็นคือ $C_{19}H_{32}O_3$ (จากการคำนวณได้ C 74.02%, H 10.39%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 4

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี ทั้งหมดที่กล่าวมาไม่พบว่ามีสารบริสุทธิ์ใดที่มีข้อมูลตรงกับสาร 5 มีเพียงสาร ent-atisane-3 β ,16 α ,17-triol ที่มีข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมใกล้เคียงกับสาร 5 ดังตารางที่ 27 แต่เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวไม่มีข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม จึงนำข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร ent-atisane-3 β ,16 α ,17-triol มาใช้ในการเปรียบเทียบแทน ดังตารางที่ 26 โดยจากข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าสาร 5 จะมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร ent-atisane-3 β ,16 α ,17-triol ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Satti N.K. และคณะ เมื่อปีค.ศ.1988 จากส่วน rhizome ของต้น *Euphorbia acualis* (10) ดังนั้นจึงคาดว่าสาร 5 เป็นสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้ทำการสกัดแยกได้มาก่อนจากพืชในวงศ์ Euphorbiaceae แต่เนื่องจากสาร 5 ที่สกัดแยกออกมาได้มีปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยวิธี 2-Dimension NMR 1H - 1H COSY และ 1H - ^{13}C COSY ได้ จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทาง สเปกโตรสโกปีทั้งหมดที่กล่าวมา และสารที่มีข้อมูลใกล้เคียงกับสาร 5 ช่วยในการสันนิษฐานโครงสร้างของสารเท่านั้น



รูปที่ 8 โครงสร้างสาร ent-atisane-3 β ,16 α ,17-triol



รูปที่ 9 โครงสร้างที่คาดว่าจะจะเป็นของสาร 5

ตารางที่ 26 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 เปรียบเทียบกับสาร ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 5	ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one
H-1 β	1.85(m)	1.85(m)
H-1 α	1.02(m)	1.38(m)
H-2 β	3.25(dddd) <i>J = 6.27, 6.00, 5.12, 5.28</i>	2.58(ddd) <i>J = 6.9, 12.3, 16.0</i>
H-2 α	2.96(m) -	2.33(ddd) <i>J = 3.2, 6.0, 16.0</i>
H-3	3.88(s)	-
H-5	1.30(m)	1.30(m)
H-6 β	1.46(m)	1.45(m)
H-6 α	1.46(m)	1.45(m)
H-7 β	1.43(m)	1.42(m)
H-7 α	0.96(m)	1.18(m)
H-9	1.32(m)	1.32(m)
H-10	0.90(m)	-
H-11 β	1.24(m)	1.24(m)
H-11 α	1.68(m)	2.03(m)
H-12	1.80(m) -	1.82(qn) <i>J = 3.0</i>
H-13, 13'	1.48(m), 1.63(m)	1.50(m), 1.63(m)
H-14, 14'	0.81(m), 1.89(m)	0.82(m), 1.87(m)
H-15, 15'	2.48(t) <i>J = 1.7</i>	1.10(m), 1.24(m) -
H-17, 17'	4.37(d) <i>J = 5.19</i> 4.45(t) <i>J = 5.73</i>	3.43, 3.57 (Abq) <i>J = 10.9</i>
18-Me	0.85(s)	1.07(s)
19-Me	0.65(m)	1.04(s)
20-Me	-	1.11(s)

ตารางที่ 25 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 เปรียบเทียบกับสาร ent-atisane-3 β ,16 α ,
17- triol

ตำแหน่ง คาร์บอน	ค่า chemical shift (ppm)	
	สาร 5	ent-atisane-3 β ,16 α ,17-triol
1	42.15(t)	42.00(t)
2	32.32(t)	32.00(t)
3	82.32(d)	82.00(d)
4	42.49(s)	42.00(s)
5	60.26(d)	59.50(d)
6	23.35(t)	23.50(t)
7	43.57(t)	43.30(t)
8	37.50(s)	38.00(s)
9	56.64(d)	56.00(d)
10	18.93(d)	32.50(s)
11	28.00(t)	28.20(t)
12	36.74(d)	36.00(d)
13	28.20(t)	28.20(t)
14	31.83(t)	31.00(t)
15	57.81(t)	57.00(t)
16	77.88(s)	77.00(s)
17	73.50(t)	73.50(t)
18	33.40(q)	33.50(q)
19	21.11(q)	21.00(q)
20	-	14.00(q)

5.1.6. ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 6

สาร 6 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลเอซิเตต 50:50 อัตราส่วนโดยปริมาตร มีลักษณะเป็นของแข็ง อัสฐานสีขาวหนัก 0.645 กรัม (0.043% โดยน้ำหนักของแก่นสกัดไคแห้ง) จุดหลอมเหลว 206 - 207 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.56 (ซิลิกาเจล : 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน)

จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่31) ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 3496, 3414 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล(OH) ที่ 1748 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่คาร์บอนิล (C=O) และที่ 1680, 913 เซนติเมตร⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่โอลิฟินิก แถบการดูดกลืนแสงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 แถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 6

แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3496, 3414	ปานกลาง, สูง	OH สั่นแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซิล
2948	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างไม่สมมาตรของหมู่ CH ₂
2859	ต่ำ	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₂
1748	สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1680, 913	ปานกลาง, ต่ำ	C=C สั่นแบบงออย่างออกนอกระนาบของหมู่โอลิฟินิก
1364	สูง	C-H สั่นแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₃
1120, 1080	ปานกลาง	C-OH สั่นแบบยืดของหมู่secondary alcohol

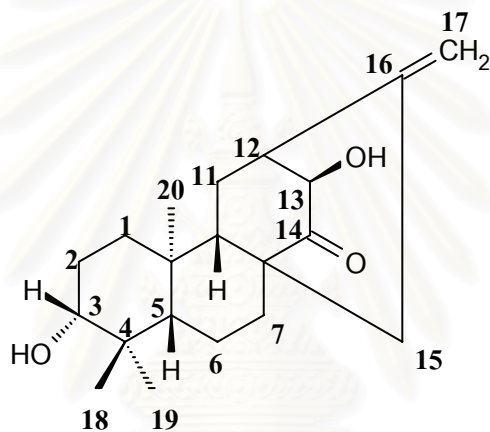
จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6 (รูปที่32) (ตารางที่29) ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิล (CH₃) ที่ค่า chemical shift (δ) : 0.65, 0.76 และ 0.99 ppm (3H,s, H-19, H-18 และ H-20 ตามลำดับ), สัญญาณที่ 3.21(1H,dd,J=11.1,4.3Hz,H-17) และ 3.84 ppm (1H,d,J=2.8Hz,H-17') แสดงลักษณะของหมู่ secondary alcohol (CH-OH), สัญญาณที่ 4.82 และ 4.97 ppm(1H,s, H-13 และ H-3 ตามลำดับ) แสดงลักษณะของหมู่โอลิฟินิก (C=CH₂)

จากข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6 (รูปที่33) (ตารางที่30) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ และจาก DEPT-135 (รูปที่33) และ DEPT-90 (รูปที่33) ทำให้ทราบว่า มีหมู่ CH₃ 3 หมู่ คือที่ค่า chemical shift (δ) : 14.04, 15.58 และ 28.41 ppm มีหมู่ CH₂ 7 หมู่ คือที่ 18.79, 25.24, 26.64, 30.76, 36.36, 43.89 และ 110.78 ppm มีหมู่ CH 5 หมู่ คือที่ 44.83, 51.93, 54.57, 75.09 (แสดงลักษณะของ secondary alcohol) และ 78.87 ppm (แสดงลักษณะของ secondary

alcohol) มีควอเตอร์เนรีคาร์บอน 4 อะตอม คือที่ 37.80, 38.67, 47.39 และ 142.71 ppm และที่เหลืออีกหนึ่งหมู่คือคาร์บอนิลคาร์บอนที่ 218.34 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่ 34) พบไอออนเชิงโมเลกุลที่ 318 ดังนั้นสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{30}O_3$ (จากการคำนวณได้ C 75.47%, H 9.43%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 6

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี ทั้งหมดที่กล่าวมาพบว่าสาร 6 แสดงข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมตรงกับสาร ent-13,3β-dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene (37) ดังตารางที่ 27 และ 28 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสาร 6 คือสาร ent-13,3β-dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Zhong-Jian Jia และคณะ เมื่อปีค.ศ. 1990 จากรากของต้น *Euphorbia sieboldiana* (37)



รูปที่ 10 โครงสร้างของสาร 6 หรือสาร ent-13,3β-dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene

ตารางที่ 29 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6 เปรียบเทียบกับสาร ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene

ตำแหน่ง โปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) และ coupling constant (Hz)	
	สาร 6	ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene
H-3	4.97(s)	4.99(s)
H-13	4.82(s)	4.83(s)
H-17	3.24(dd) <i>J = 11.1, 4.3</i>	3.21(dd) <i>J = 11.6, 4.4</i>
H-17'	3.84(d) <i>J = 2.8</i>	3.85(d) <i>J = 3</i>
H-18	0.72(s)	0.76(s)
H-19	0.65(s)	0.65(s)
H-20	0.98(s)	0.99(s)

ตารางที่ 30 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6 เปรียบเทียบกับสาร ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene

ตำแหน่ง คาร์บอน	ค่า chemical shift (ppm)	
	สาร 6	ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene
1	36.36(t)	36.45(t)
2	26.64(t)	26.60(t)
3	78.87(d)	78.87(d)
4	38.67(s)	38.70(s)
5	54.57(d)	54.06(d)
6	18.79(t)	18.84(t)
7	30.76(t)	30.83(t)
8	47.39(s)	47.43(s)
9	51.93(d)	52.02(d)
10	37.80(s)	37.84(s)
11	25.24(t)	25.31(t)
12	44.83(d)	44.91(d)
13	75.09(d)	75.12(d)
14	218.34(s)	218.23(s)
15	43.89(t)	43.94(t)
16	142.71(s)	142.76(s)
17	110.78(t)	110.75(t)
18	28.41(q)	28.45(q)
19	15.58(q)	15.61(q)
20	14.04(q)	14.07(q)

บทที่ 6

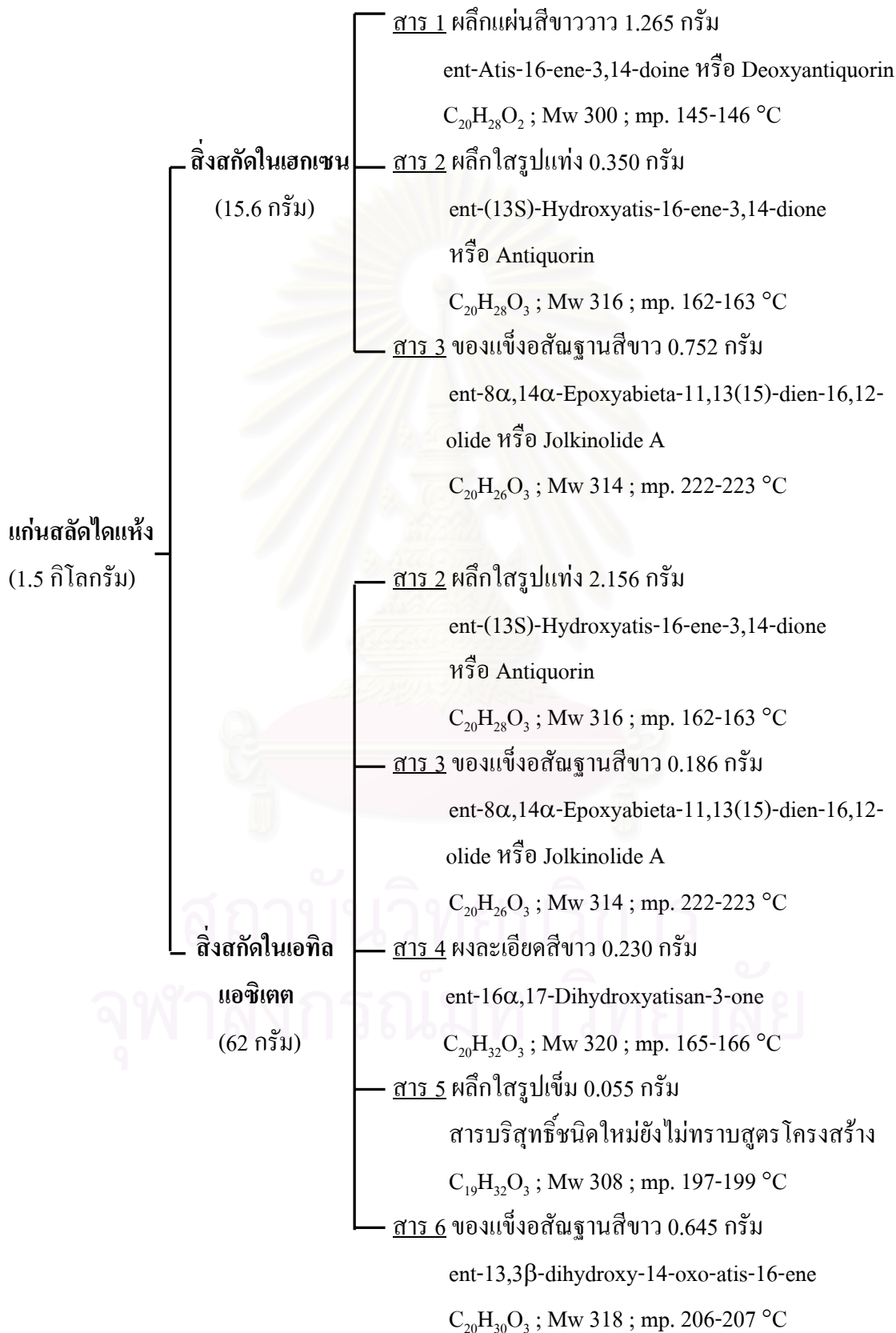
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในส่วนแก่นของต้นสลัดได *Euphorbia antiquorum* Linn. ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae พบว่า เมื่อนำสิ่งสกัดด้วยเฮกเซนมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถแยกสารบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มไดเทอร์ปีน (diterpene) ได้ 3 ชนิดคือ ent-Atis-16-ene-3,14-dione หรือ Deoxyantiquorin, ent-(13S)-Hydroxyatis-16-ene-3,14-dione หรือ Antiquorin และ ent-8 α ,14 α -Epoxyabieta-11,13(15)-dien-16,12-olide หรือ Jolkinolide A ตามลำดับ และในสิ่งสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์สามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ในกลุ่มไดเทอร์ปีนได้ 4 ชนิดคือ Antiquorin, Jolkinolide A (เหมือนในสิ่งสกัดเฮกเซน), ent-16 α ,17-Dihydroxyatisan-3-one, ent-13,3 β -dihydroxy-14-oxo-atis-16-ene และสารอีก 1 ชนิดซึ่งคาดว่าเป็นสารชนิดใหม่ แต่ยังไม่สามารถบอกสูตรโครงสร้างที่แน่นอนได้ สรุปการแยกสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ได้ดังแผนภาพที่ 5

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ พบว่า สาร 3 และสาร 5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีทั้ง 5 ชนิด สาร 6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620(ลำไส้) และ Kato-3(กระเพาะ) ได้ในระดับปานกลาง และสาร 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง Kato-3(กระเพาะ) ได้ดี โดยสาร 5 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Hep-G2 (กระเพาะ) และ BT474 (เต้านม) ได้ดีที่ค่า IC₅₀ 2.9 และ 2.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 5 สารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของแก่นสลัดไค ซึ่งแยกได้โดยใช้ตัวทำละลาย
เฮกเซนและเอทิลเอซิเตต



รายการอ้างอิง

1. วุฒิ วุฒิชัยธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพร:รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 426.
2. เพยาร์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2537. สมุนไพรแก้วไคล. กรุงเทพมหานคร:เมดิคัล มีเดีย จำกัด. หน้า 60.
3. สายสนม กิตติขจร. 2526. ตำราสรรพคุณสมุนไพรยาไทยแผนโบราณ. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์อักษรไทย. หน้า 247.
4. Anjaneyulu, V.; and Rao, G.S. 1971. Crystalline Constituent of Euphorbiaceae: Part XII- Isolation of Cycloarterol from *Euphorbia antiquorum* & a Partial Synthesis of Perkeol & Agnosterol. Indian Journal of Chemistry. 9:20-23.
5. Zhi-da, M.; Mizuno, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M.; Guang-Yi, X.; and Qing, H. 1989. A Diterpene from *Euphorbia antiquorum*. Phytochemistry. 28(2):553-555.
6. Gewali, M.b.; Hattori, M.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; and Namba, T. 1989. Four Ingol type Diterpene from *Euphorbia antiquorum* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 37(6):1547-1549.
7. Anjaneyulu, V.; and Ravi, K. 1989. Terpenoids from *Euphorbia antiquorum*. Phytochemistry. 28(6):1695-1697.
8. Gewali, M.b.; Hattori, M.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; and Namba, T. 1990. Constituents of the Latex of *Euphorbia antiquorum*. Phytochemistry. 29(5):1625-1628.
9. Satti, N.K.; Suri, O.P.; Dhar, K.L.; Atal, C.K.; Kawasaki, T.; Miyahara, K.; and Kawano, S. 1986. High Resolution NMR and X-ray Crystallography Data of Caudicifolin from *Euphorbia acaulis*. Phytochemistry. 25(6):1411-1413.
10. Satti, N.K.; Suri, O.P.; Thaper, R.K.; and Kachroo, P.L. 1988. Ent-Atisane-3 β ,16 α ,17-triol, a diterpene from *Euphorbia acaulis*. Phytochemistry. 27(5):1530-1531.
11. Oksuz, S.; Gurek, F.; Lin, L.; Gil, R.R.; Pezzuto, J.M.; and Cordell, G.A. 1996. Aleppicatines A and B from *Euphorbia aleppica*. Phytochemistry. 42(2):473-478.
12. Terasa, P.; Urones, J.G.; Marcos, I.S.; Basabe, P.; Cuadrado, M.J.S.; and Moro, R.F. 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. Phytochemistry. 26(6):1767-1776.
13. Ferriera, M.U.; and Ascenso, J.R. 1999. Steroids and Tetracyclic diterpene from *Euphorbia boetica*. Phytochemistry. 51:439-444.

14. Ahmad, V.D.; and Jassbi, A.R. 1998. Three Tricyclic Diterpenoids from *Euphorbia decipiens*. Planta Medica. 64:732-735.
15. Ahmad, V.D.; and Jassbi, A.R. 1998. Two Pentacyclic Diterpene Ester from *Euphorbia decipiens*. Phytochemistry. 48(7):1217-1220.
16. Xu, Z.H.; Sun, J.; Xu, R.S.; and Qin, G.W. 1998. Casbane Diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata*. Phytochemistry. 49(1):149-151.
17. Gunther, G.; Hohmann, J.; Vasas, A.; Mathe, I.; Dombi, G.; and Jarkovich, G. 1998. Jatrophone Diterpenoids from *Euphorbia esula*. Phytochemistry. 47(7):1309-1313.
18. Lal, A.R.; Cambie, R.C.; Rutledge, P.S.; and Woodgate, P.D. 1990. Ent-Atisane Diterpenes From *Euphorbia fidjiana*. Phytochemistry. 29(6):1925-1935.
19. Lal, A.R.; Cambie, R.C.; Rutledge, P.S.; and Woodgate, P.D. 1990. Ent-Pimarane and Ent-abietane Diterpenes from *Euphorbia fidjiana*. Phytochemistry. 29(7):2239-2246.
20. Che, C.T.; Zhou, T.K.; Ma, Q.G.; Qin, G.W.; Williams, I.D.; Wu, H.M.; and Shi, Z.S. 1999. Diterpenes and aromatic compounds from *Euphorbia fischeriana*. Phytochemistry. 52:117-121.
21. Yoshida, T.; Amakura, Y.; Liu, Y.Z.; and Okuda, T. 1994. Tannins and Related Polyphenols of Euphorbiaceous Plants XI. Three New Hydrozable Tannins and a Polyphenol Glucoside from *Euphorbia humifusa*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 42(9): 1803-1807.
22. Wu, T.S.; Lin, Y.M.; Haruna, M.; Pan, D.J.; and Shingu, T. 1991. Antitumor Agents, 119. Kansuiphorins A and B, Two novel Antileukemic Diterpene Esters from *Euphorbia kansui*. Journal of Natural Products. 54(3):823-829.
23. Oksuz, S.; Gurek, F.; Gil, R.R.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J.M.; and Cordell, G.A. 1995. Four Diterpene Ester from *Euphorbia myrsinites*. Phytochemistry. 38(6):1457-1462.
24. Ilyas, M.; Parveen, M.; and Amin, K.M.Y. 1998. Neriifolione, a triterpene from *Euphorbia neriifolia*. Phytochemistry. 48(3):561-563.
25. Marco, J.A.; Sanz-Cervera, J.F.; Checa, J.; Palomares, E.; and Fraga, B.M. 1999. Jatrophone and Tigiane Diterpenes from the Latex of *Euphorbia obtusifolia*. Phytochemistry. 52:479.
26. Jakupovic, J.; Morgenstern, T.; Marco, J.A.; and Berendsohn, W. 1998. Diterpenes from *Euphorbia paralias*. Phytochemistry. 47(8):1611-1619.

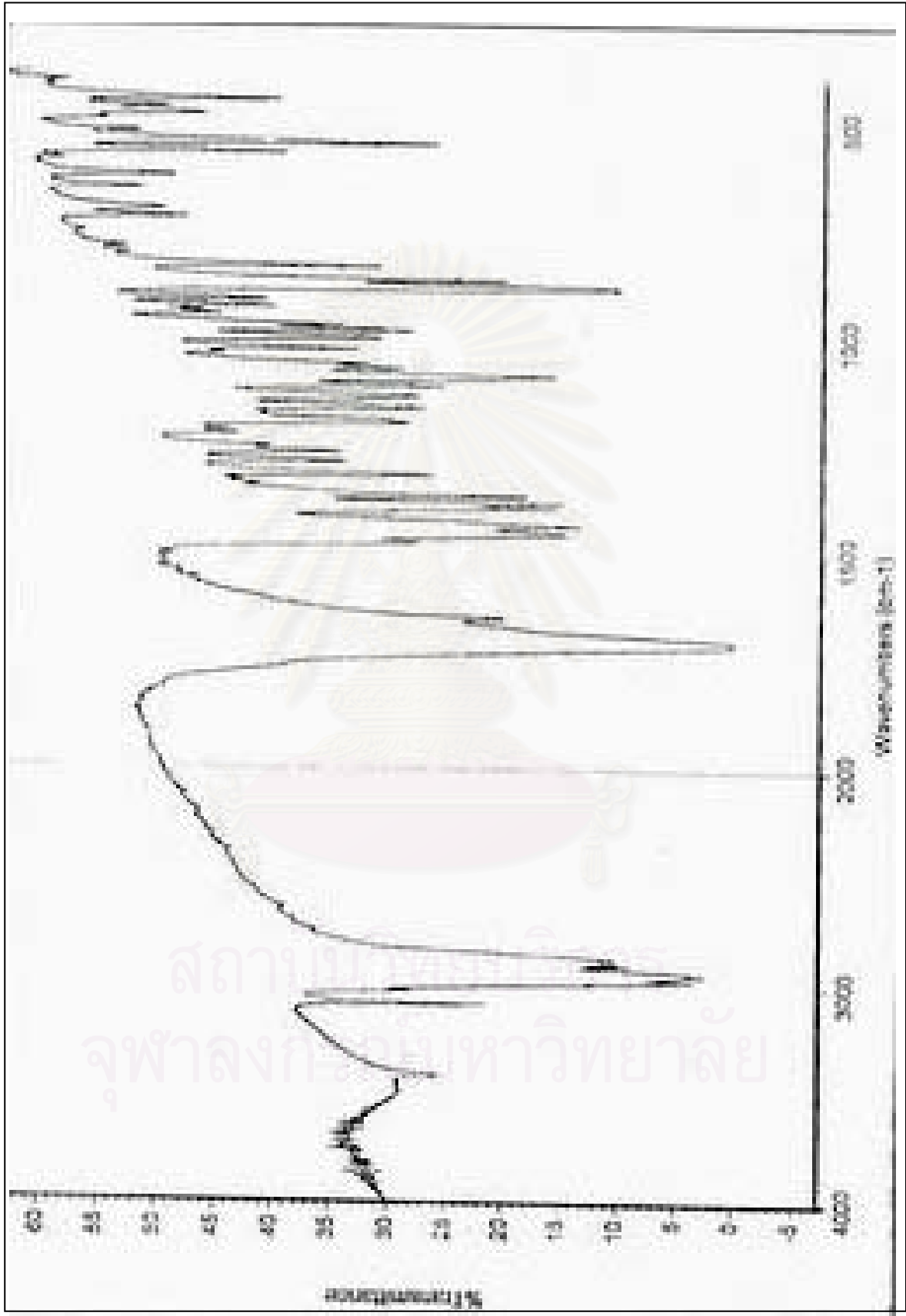
27. Fatope, M.O.; Zeng, L.; Ohayaga, J.E.; Shi, G.; and McLaughlin, J.L. 1996. Selectively Cytotoxicity Diterpenes from *Euphorbia poissonii*. Journal of Medicinal Chemistry. 39:1005-1008.
28. Dominguez, X.A.; Delgado, J.G.; Maffey, M.L.; Mares, J.G.; and Rombold, C. 1967. Chemical Study of the Latex, Stem, Bracts and Flowers of “ Christmas Flower” (*Euphorbia pulcherrima*) I. Tetrahedron. 56(9):1184-1185.
29. Mbwambo, Z.H.; Lee, S.K.; Mushiu, E.N.; Pezzuto, J.M.; and Kinghorn, A.D. 1996. Constitutens from the Stem Wood of *Euphorbia quinquecostata* with Phorbol Dibutyrate Receptor-Binding Inhibitory Activity. Journal of Natural Products. 59: 1051-1055.
30. Upadhyay, R.R.; and Hecker, E. 1975. Diterpene Ester of the Irritant and Cocarcinogenic Latex of *Euphorbia lactea*. Phytochemistry. 14:2514-2515.
31. Hohmann, J.; Evanics, F.; Dombi, G.; Molnar, J.; and Szabo, P. 2001. Euphorsalicin, a new Diterpene Polyester with Multidrug Resistance Reversing Activity from *Euphorbia salicifolia*. Tetrahedron. 57:211-215.
32. Hohmann, J.; Evanics, F.; Dombi, G.; and Szabo, P. 2001. Salicifoline and Salicinolide, New Diterpene Polyesters from *Euphorbia salicifolia*. Tetrahedron Letters. 42:6581-6584.
33. Ferriera, M.U.; Madureira, A.M.; and Ascenso, J.R. 1998. A Tetracyclic Diterpene and Triterpenes from *Euphorbia segetalis*. Phytochemistry. 49(1):179-183.
34. Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G.C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; and Ballero, M. 1998. Macrocyclic Diterpenoides from *Euphorbia semiperfoliata*. Journal of Natural Products. 61:749-756.
35. Hohmann, J.; Redei, D.; Evanics, F.; Kalman, A.; Argay, G.; and Bartok, T. 2000. Serrulatin A and B, New Diterpene Polyesters from *Euphorbia serrulata*. Tetrahedron. 56:3619-3623.
36. Sutthivaiyakit, S.; Thasut, M.; and Prachayasittikul, V. 2000. Constitutents and Bioactivity of the Tubes of *Euphorbia sessiliflora*. Phytochemistry. 53:947-950.
37. Jia, Z.J.; Ding, Y.L.; Wang, Q.G.; and Liu, Y.T. 1990. Two Diterpene from *Euphorbia sieboldiana*. Phytochemistry. 29(7):2343-2345.
38. Marco, J.A.; Sanz-Cervera, J.F.; Yuste, A.; Jakupovic, J.; and Jeske, F. 1998. Jatrophone Derivatives and a Rearranged Jatrophone from *Euphorbia terracina*. Phytochemistry. 47(8):1621-1630.

39. Shi, J.G.; Shi, Y.P.; and Jia, Z.J. 1997. Sesquiterpenoids from *Euphorbia wangii*. Phytochemistry. 45(2):343-347.
40. Bringmann, G.; Schlaver, J.; Risher, H.; Wohlfarth, M.; Muhlbacher, J.; Buske, A.; Porzel, A.; Schmidt, J.; and Adam, G. 2000. Revised Structure of Antidesmone, an Unusual Alkaloid from Tropical *Antidesma* Plants (Euphorbiaceae). Tetrahedron. 56:3691-3695.
41. Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monk, A.; Hursey, M.L.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.H.; and Boyd, M.R. 1988. Feasibility of Drug Screening with panels of Human Tumor Cell lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. Cancer Research. 48:589-601.
42. Carmichael, J.; DeGraff, W.G.; Gazdar, A.F.; Minna, J.D.; and Mitchell, J.B. 1987. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity testing. Cancer Research. 47:936-942.
43. Twentyman, P.R.; and Luscombe, M. 1987. A Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity. British Journal of Cancer. 56:279-285.
44. Uemura, D.; and Hirata, Y. 1972. Two New Diterpenoids, Jolkinolide A and B, Obtained from *Euphorbia Jolkini* Boiss. (Euphorbiaceae). Tetrahedron Letter. 15:1387-1390.
45. นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์. 2532. พืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 86.
46. พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร:สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย. หน้า 53.
47. สมภพ ประธานธรรารักษ์. 2539. อนุกรมวิธานพืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร:ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 238.
48. Anjaneyulu, V.; Rao, G.S.; and Connolly, J.D. 1985. Occurrence of 24-Epimers of Cycloart-25-ene-3 β ,24-diols in the stem of *Euphorbia trigona*. Phytochemistry. 24(7):1610-1612.
49. Huang, K.G.; 1993. The Pharmacology of Chinese Herbs. USA.:CRC Press, Inc. p.310-311.
50. Tanaka, R.; Kasubuchi, K.; Kita, S.; Tokuda, H.; Nishino, H.; and Matsunaga, S. 2000. Bioactive Steroids from the Whole Herb of *Euphorbia Chamaesyce*. Journal of Natural Products. 63:99-103.
51. Tanaka, R.; Kasubuchi, K.; Kita, S.; and Matsunaka, S. 1999. Odtusifoliol and Related Steroids from the Whole Herb of *Euphorbia chameasyce*. Phytochemistry. 51:457-463.

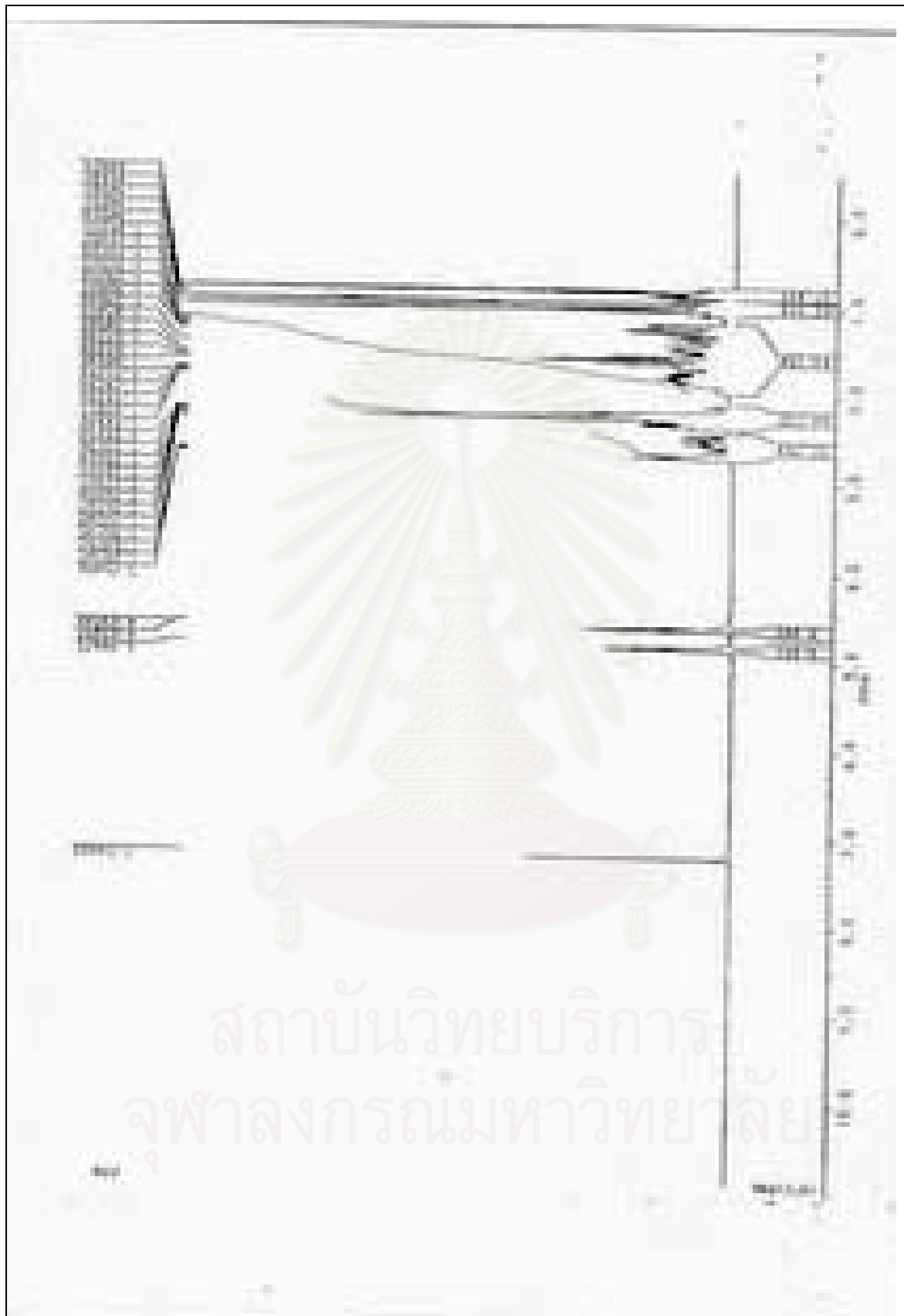


ภาคผนวก

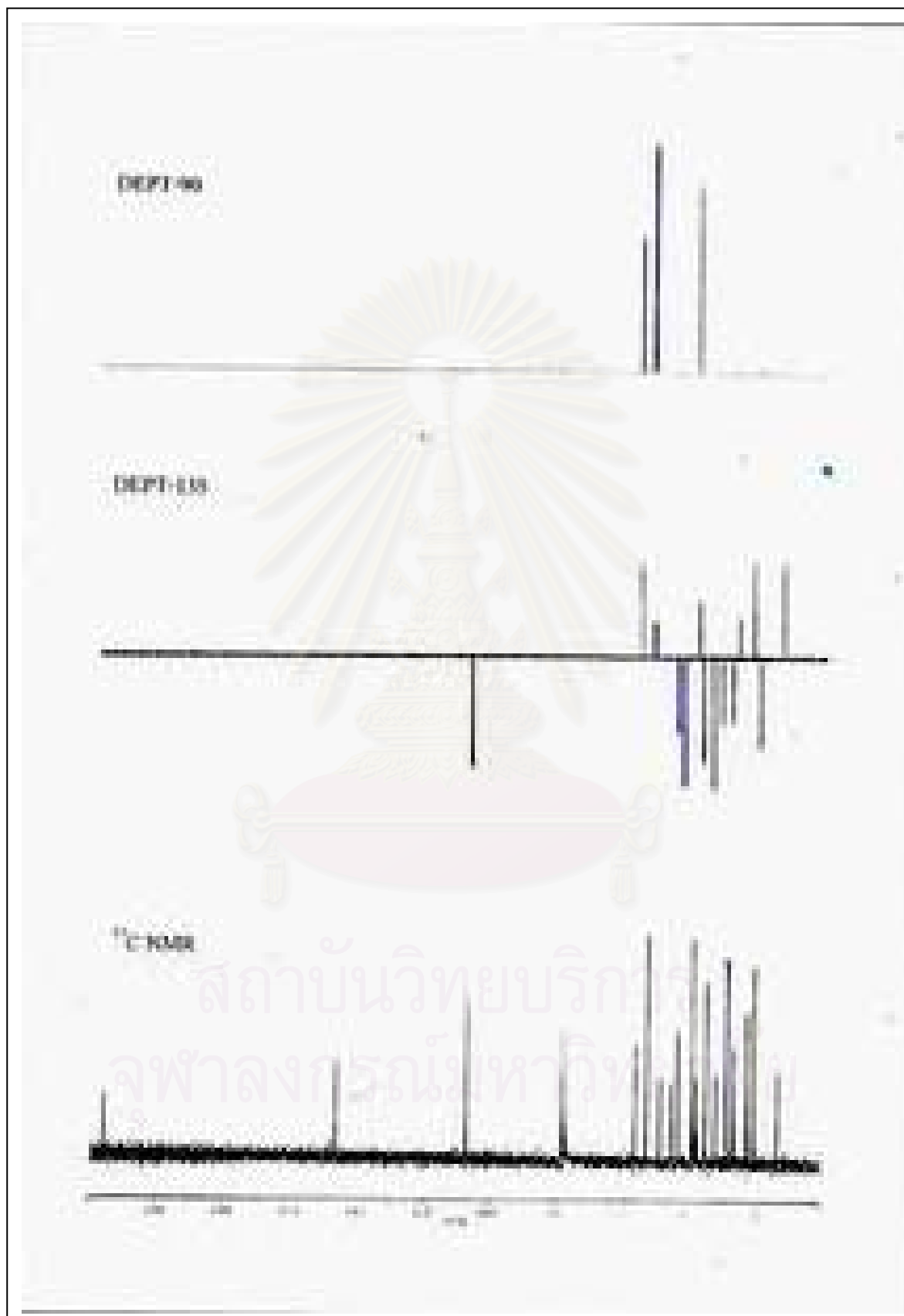
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



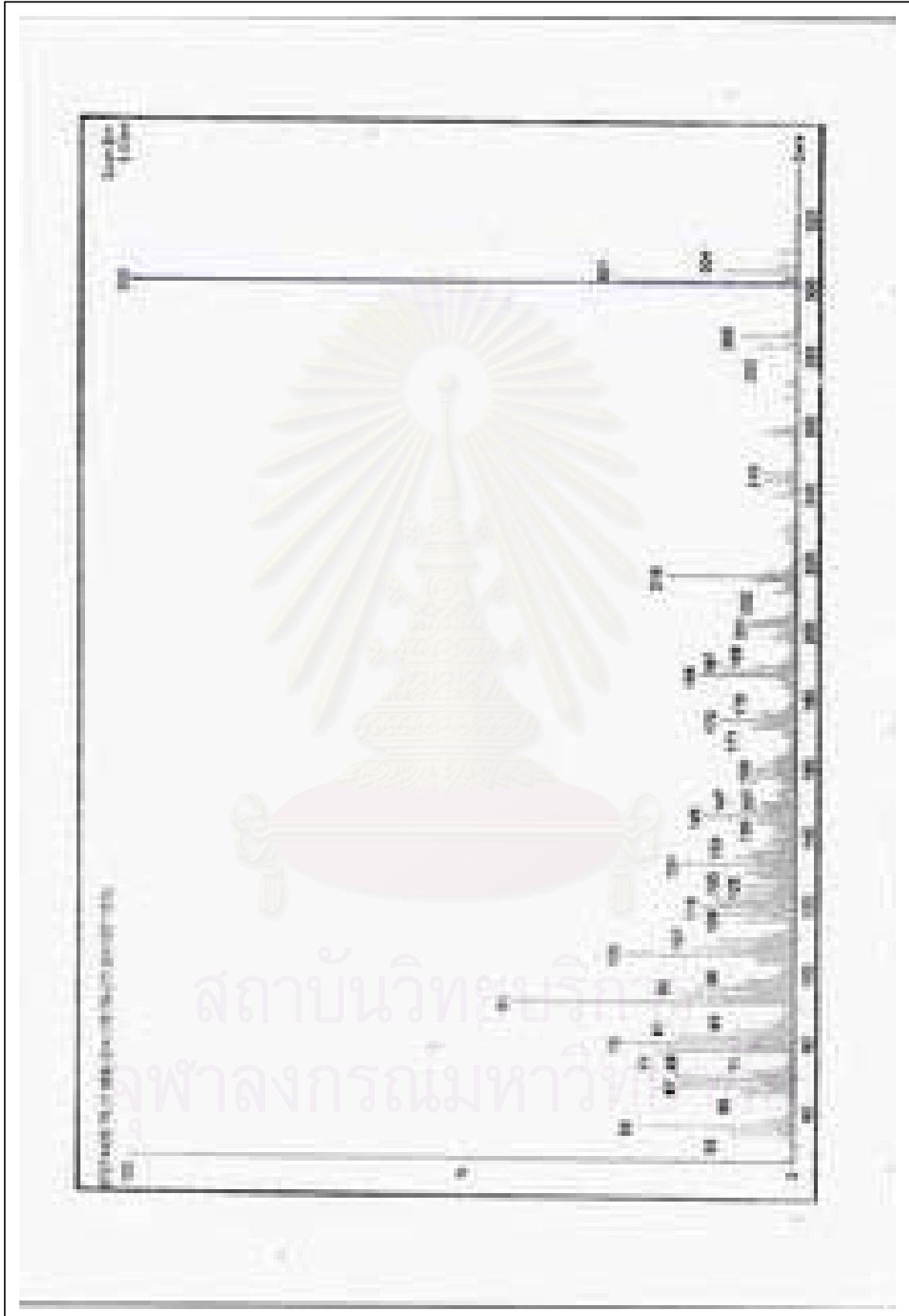
รูปที่ 11 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1



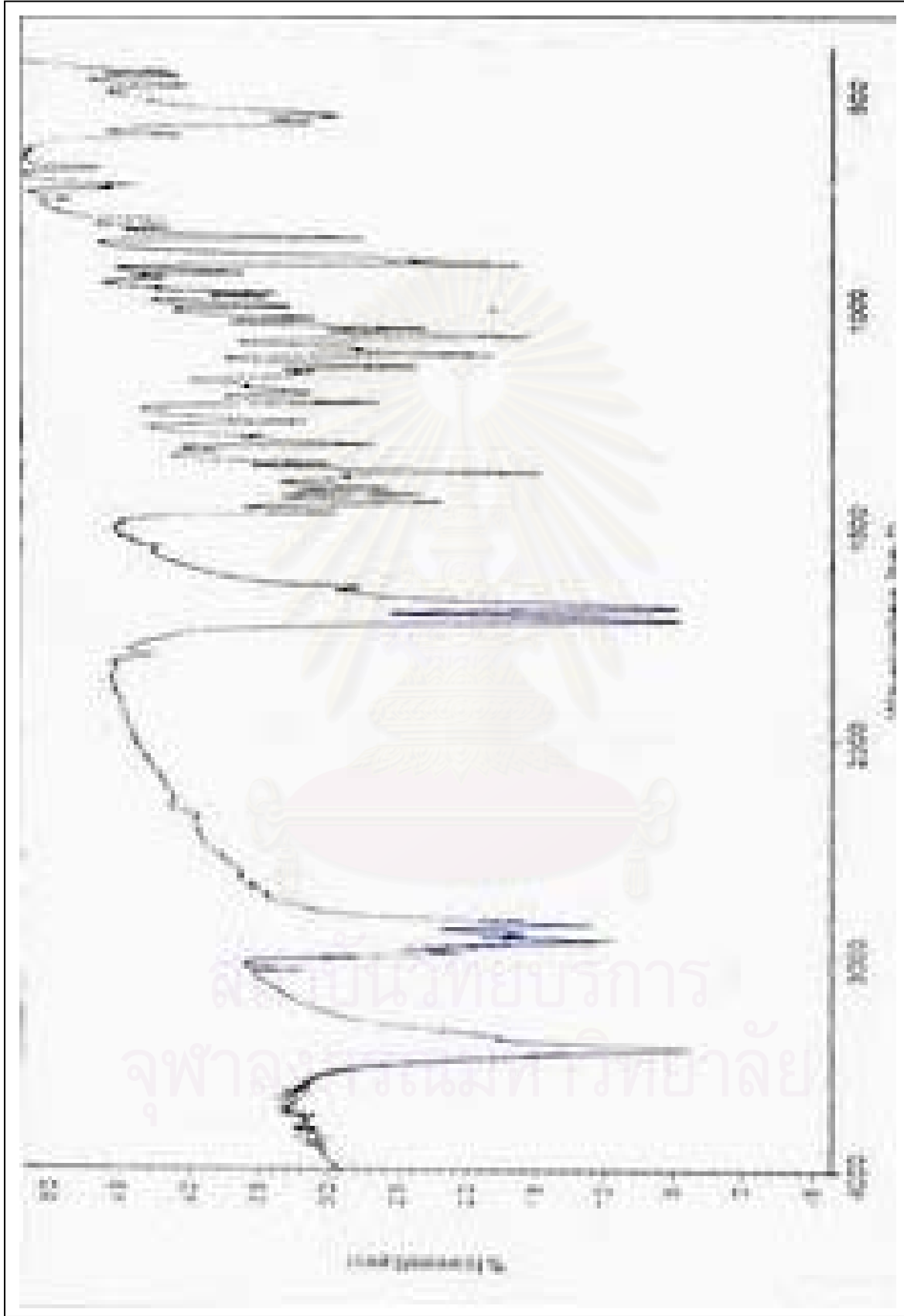
รูปที่ 12 โปรงตอนเห็นเอมอาร์สปรคตรัมของตาร 1



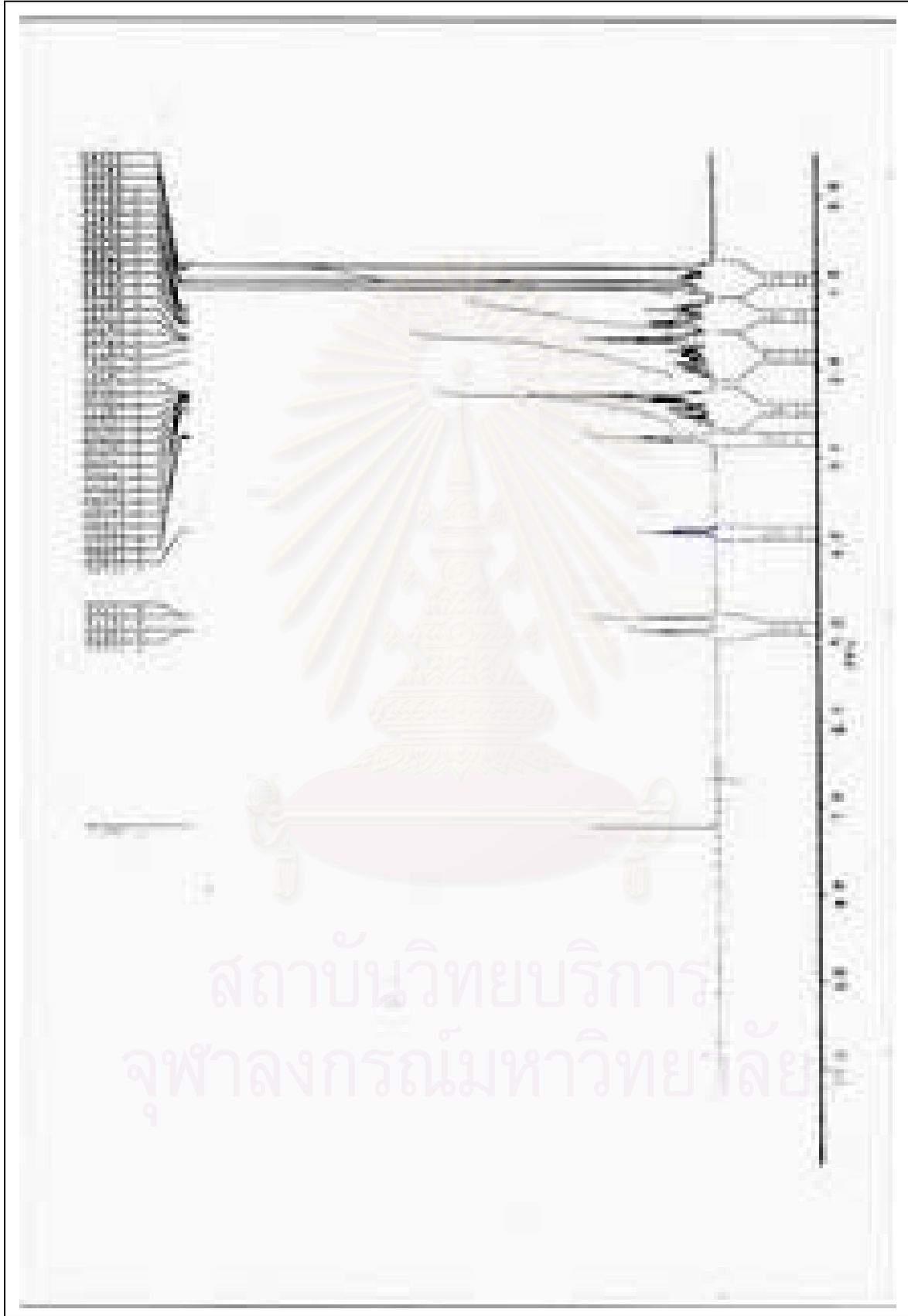
รูปที่ 13 คาร์บอน-13, DEPT-135 และ DEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1



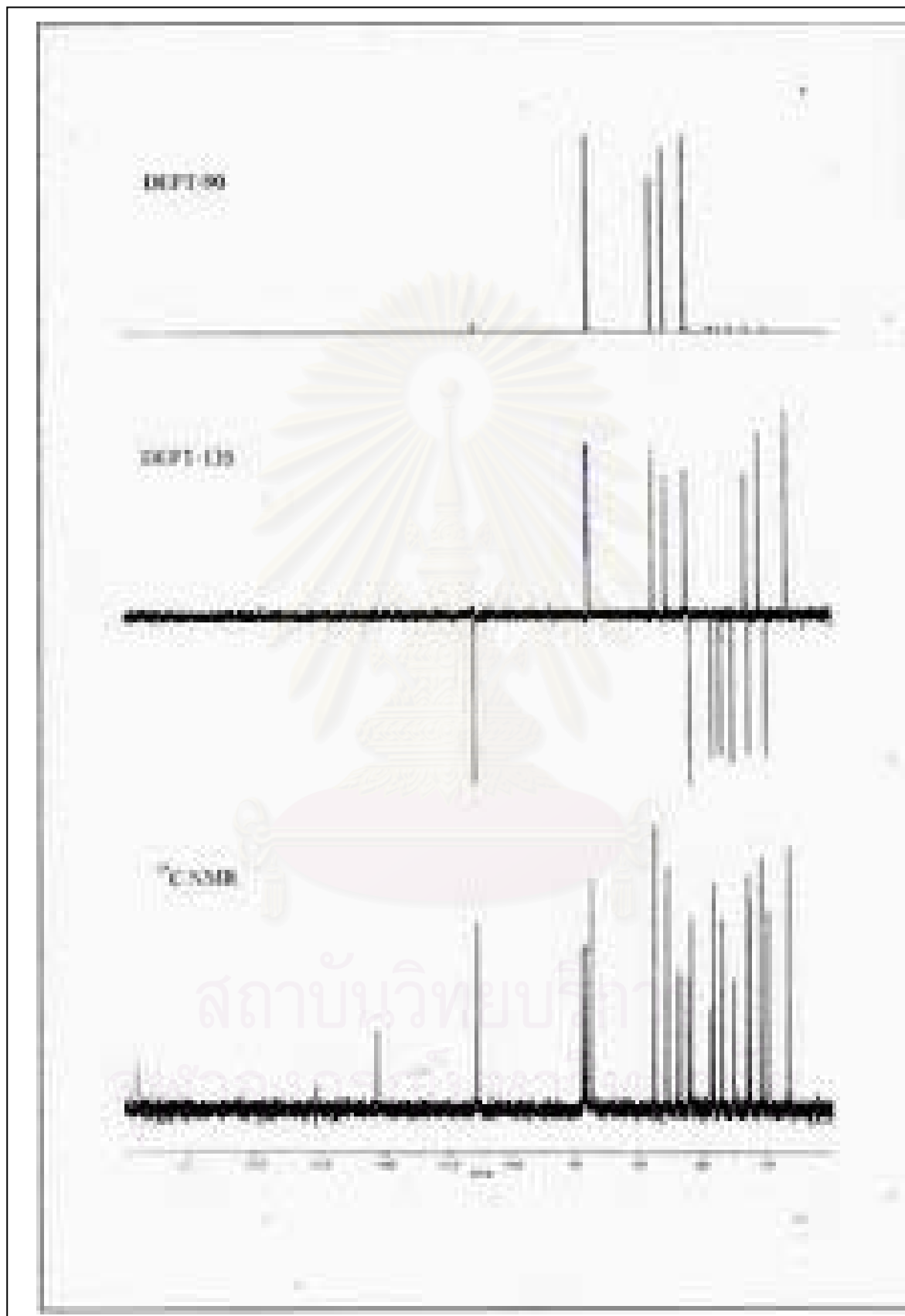
รูปที่ 18 เมตสเปกตรัมของสาร 1



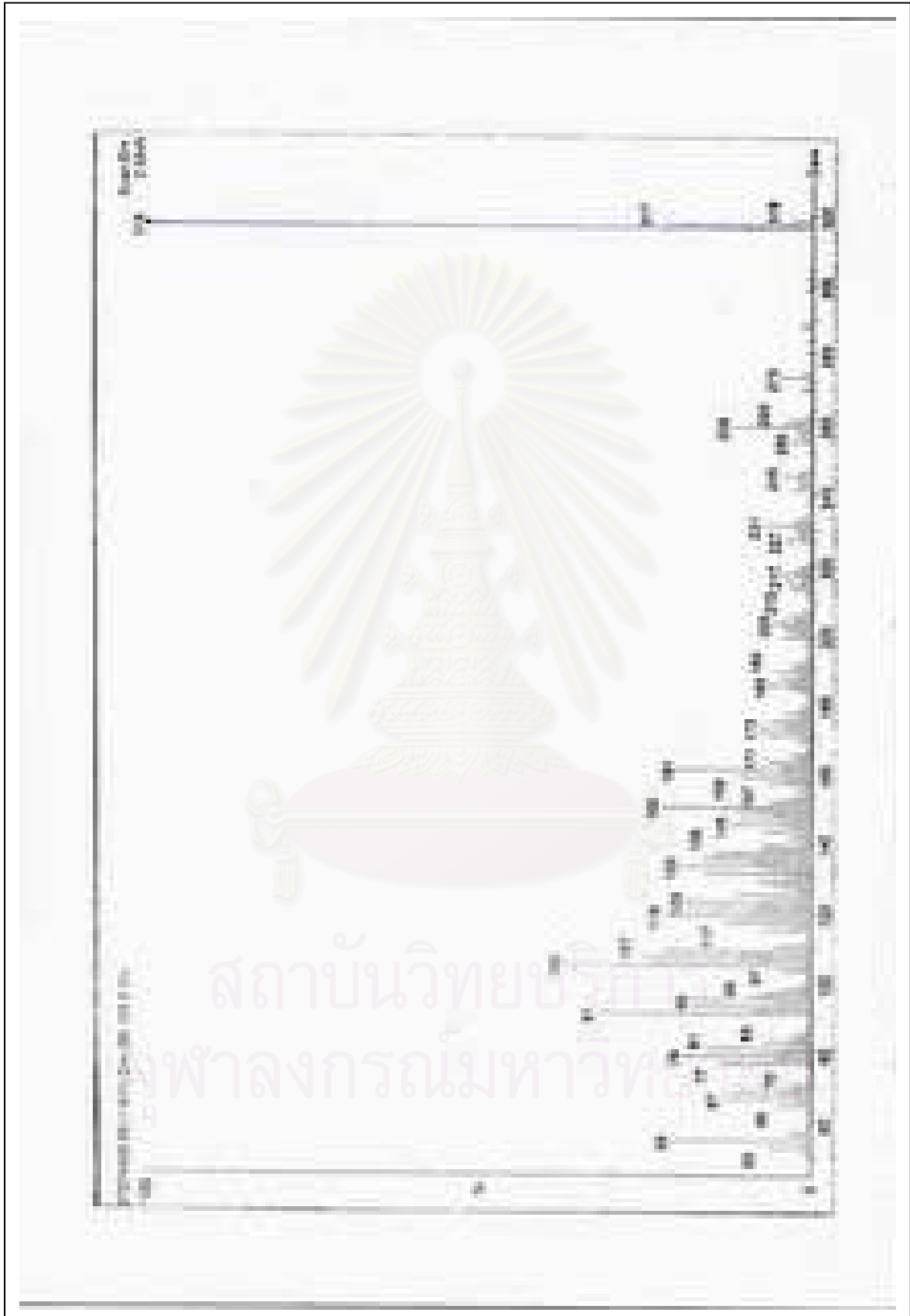
รูปที่ 15 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2



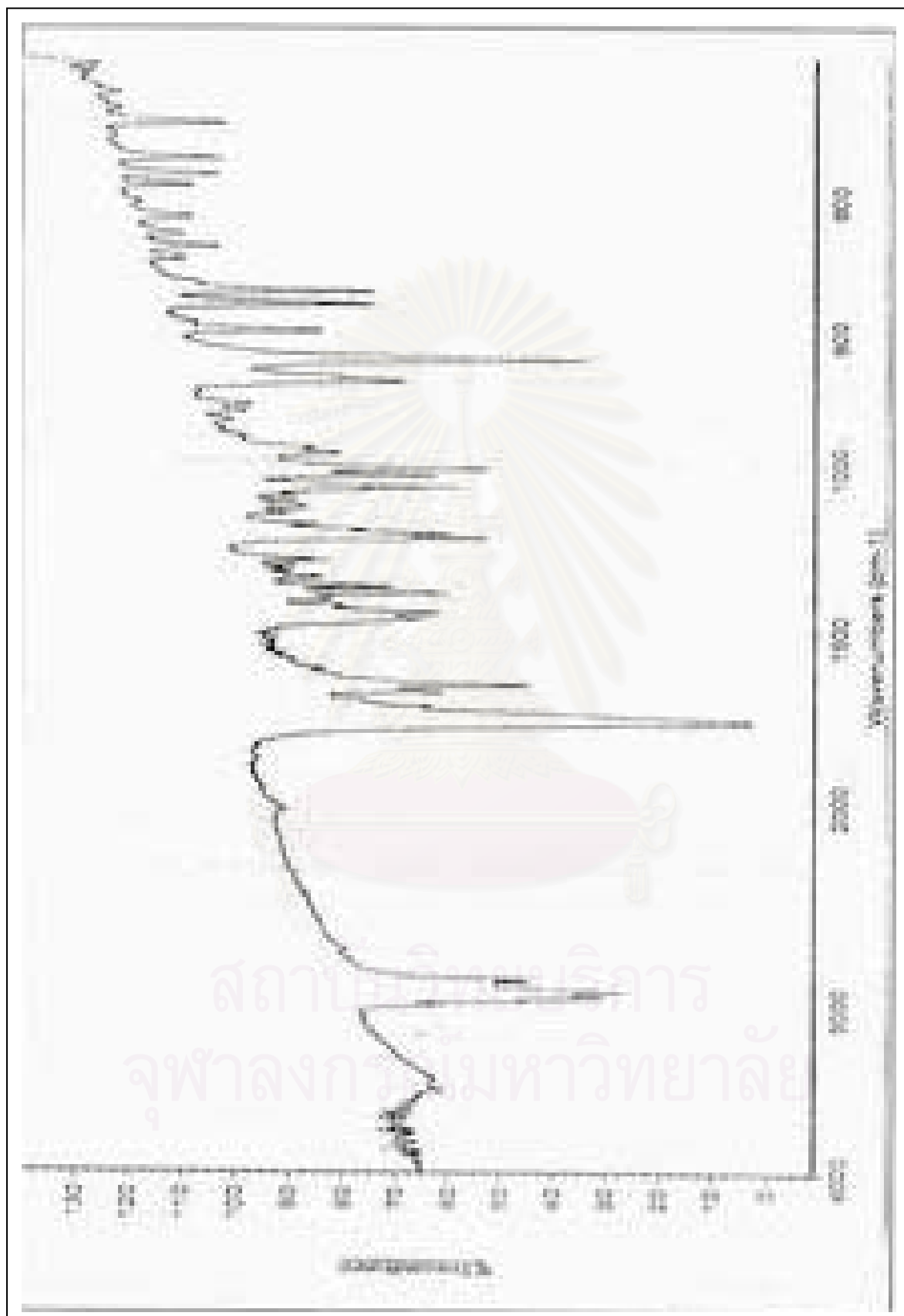
รูปที่ 16 โบราณอนเอ็นเอ็นอาร์สปกตรึมองสาร 2



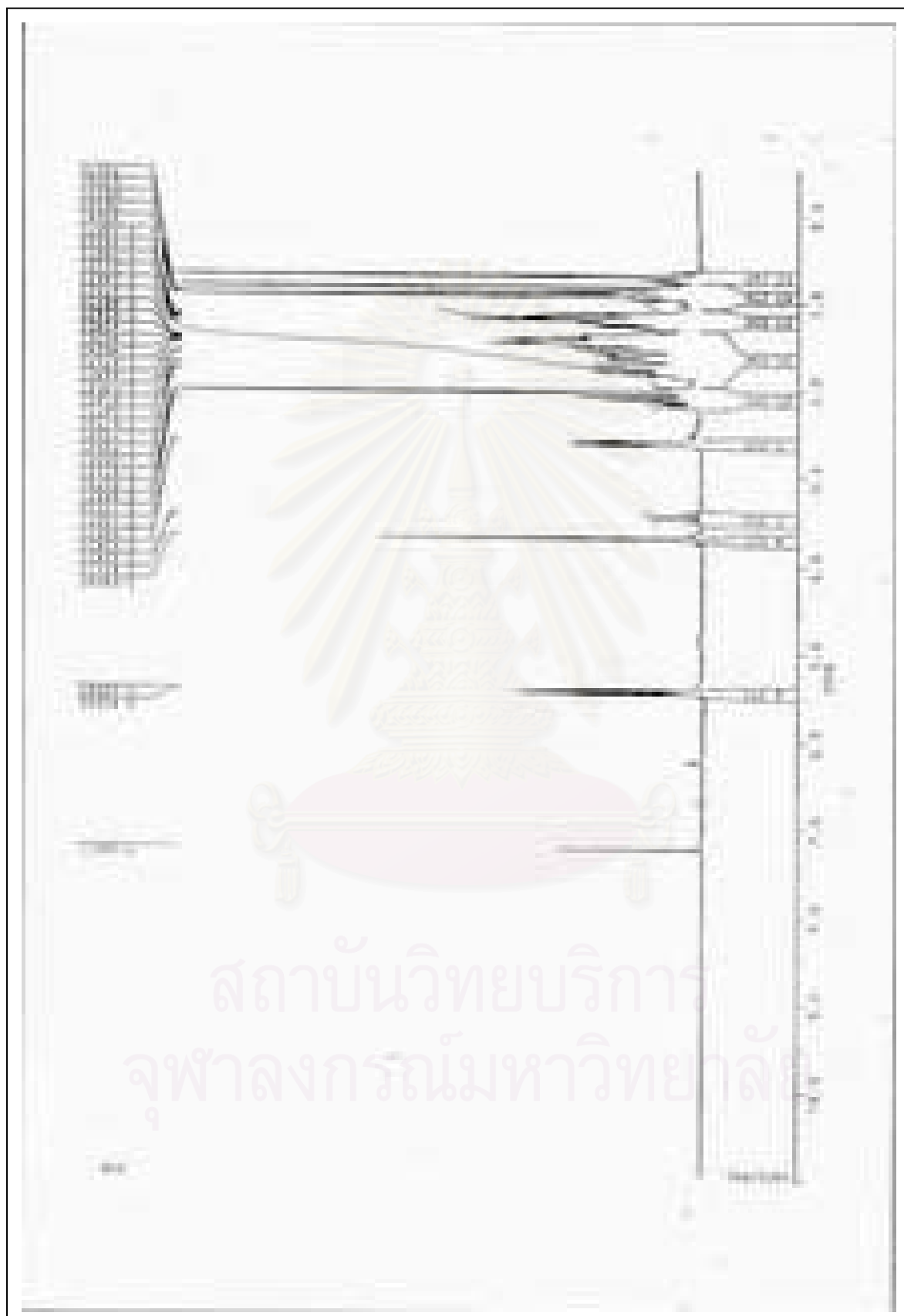
รูปที่ 13 คาร์บอน-13, DEPT-135 และ DEPT-90 เอ็น เอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2



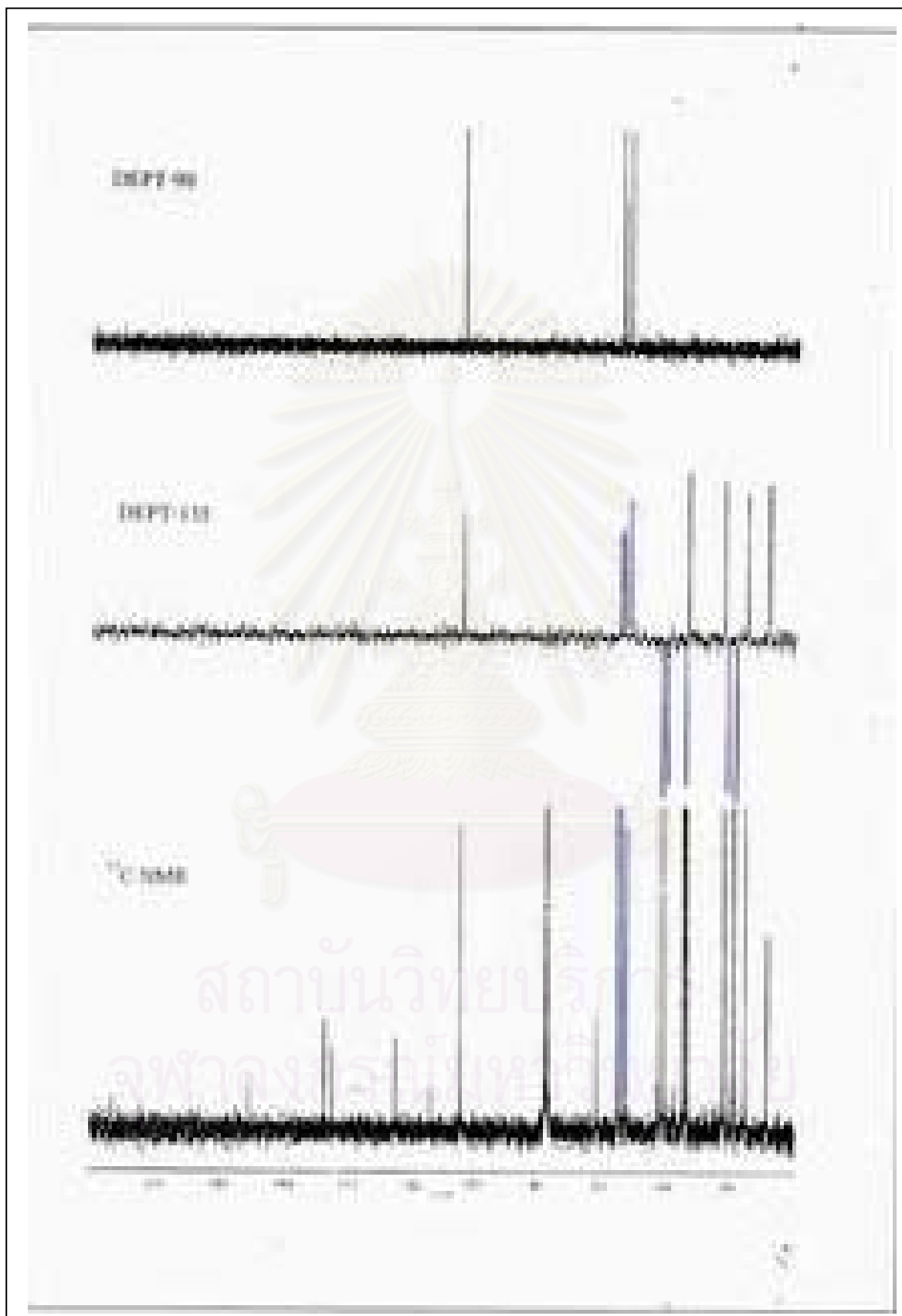
รูปที่ 18 เมตสเปกตรัมของสาร 2



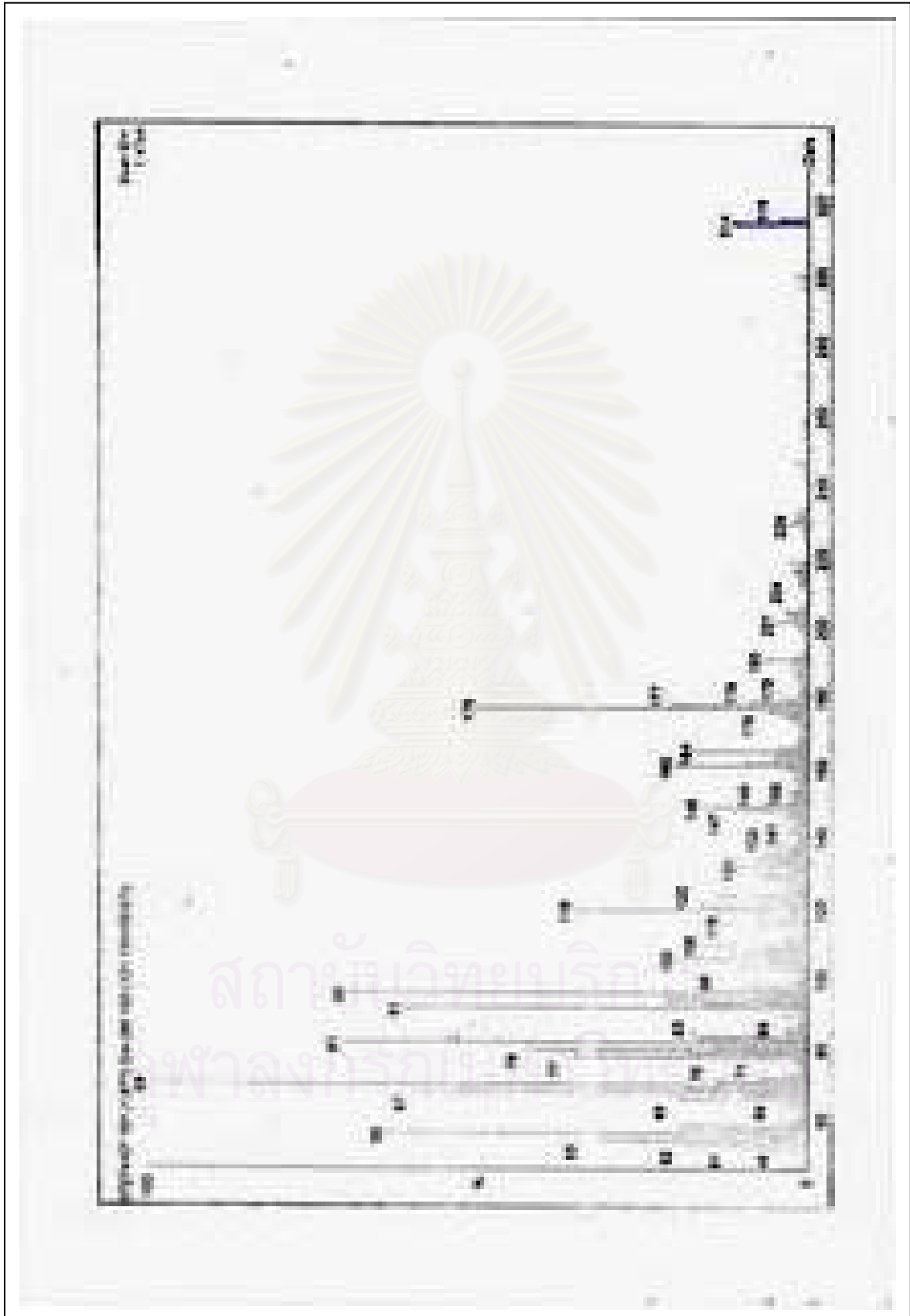
รูปที่ 19 อินฟราเรดเขตวัยของสาร 3



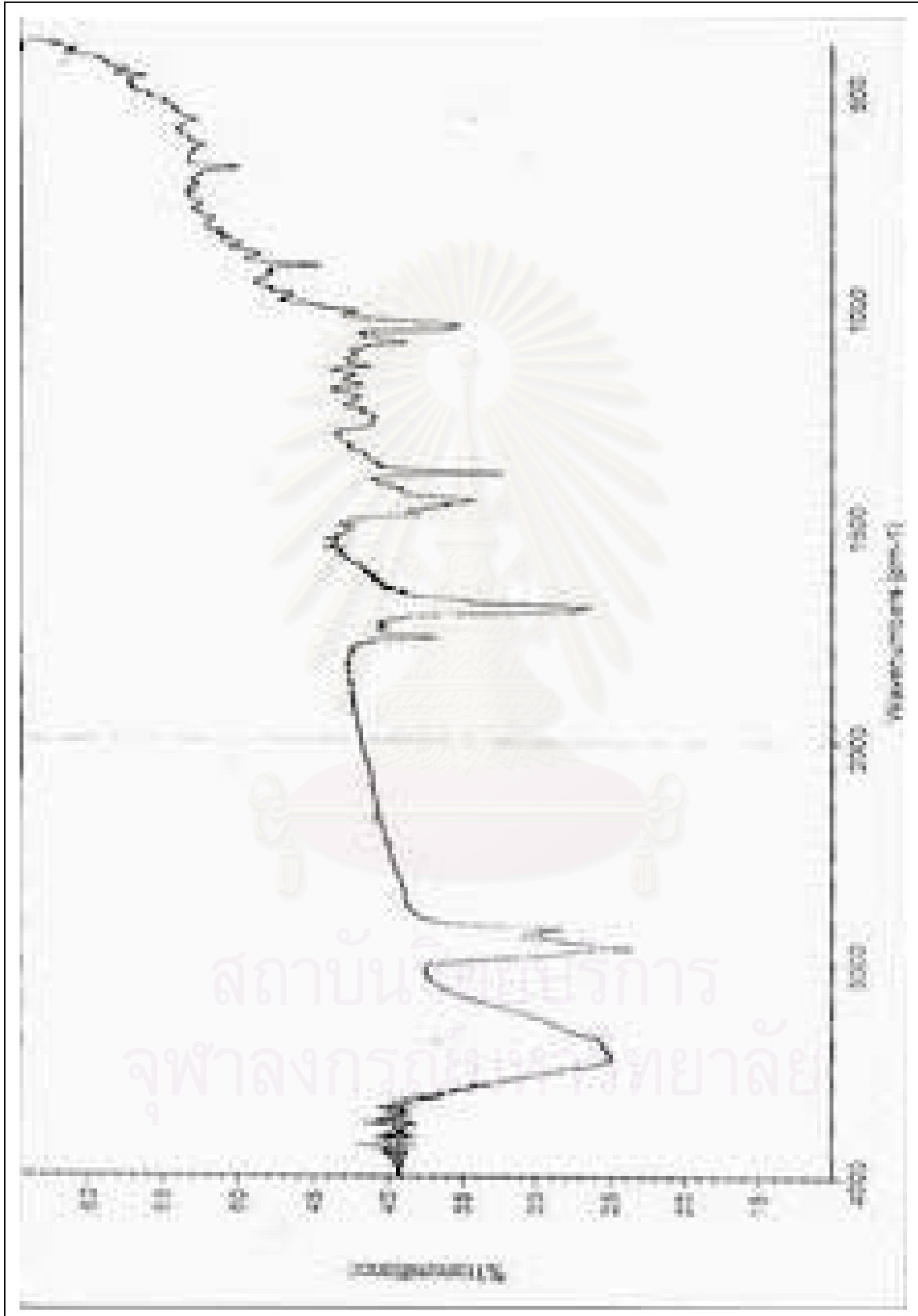
รูปที่ 20 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3



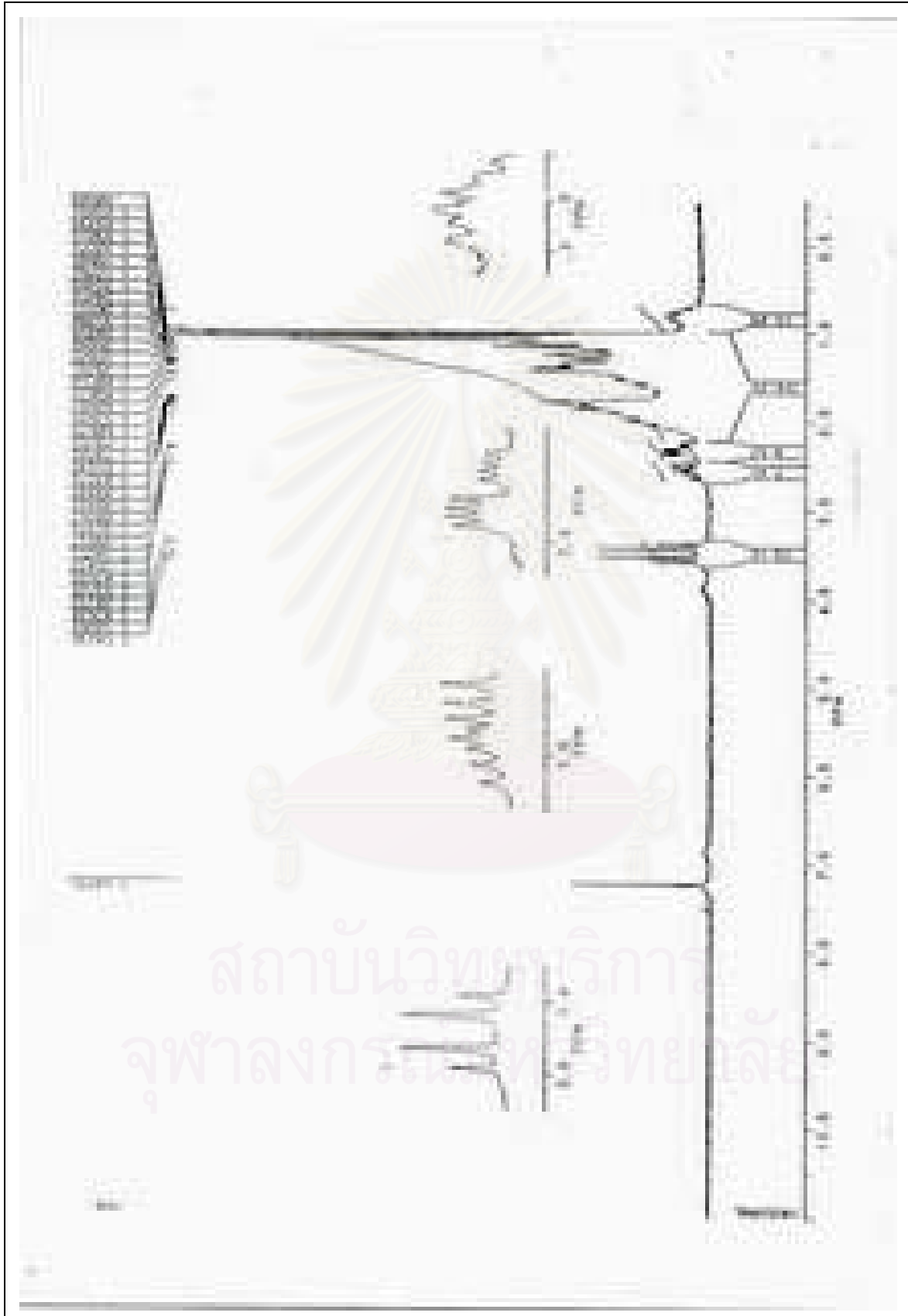
รูปที่ 21 คาร์บอน-13, DEPT-135 และ DEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตร้าของสาร 3



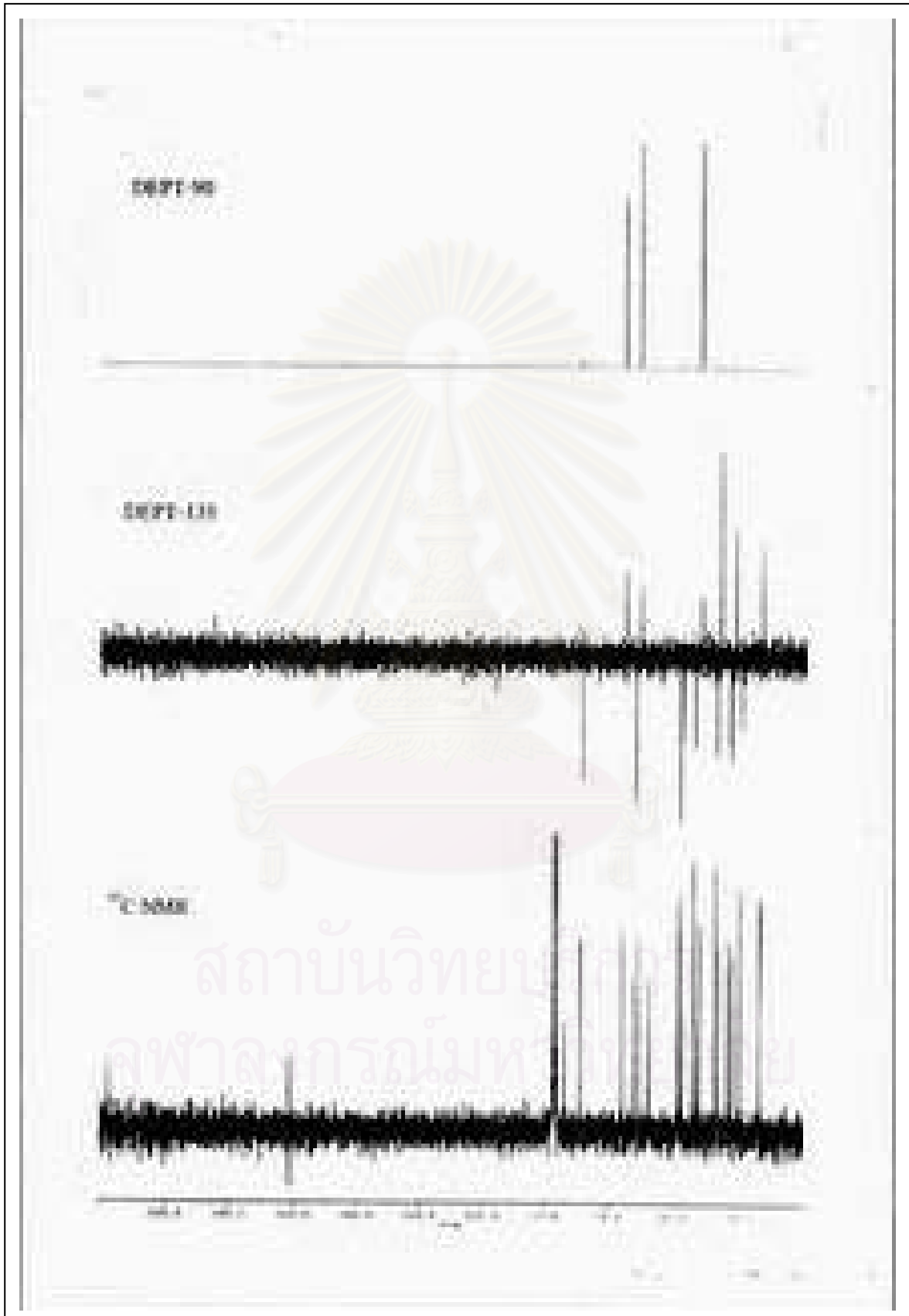
รูปที่ 22 แผนที่โครงร่างของสาร 3



รูปที่ 23 อินพุตเรดสเปกตรัมของสาร 4



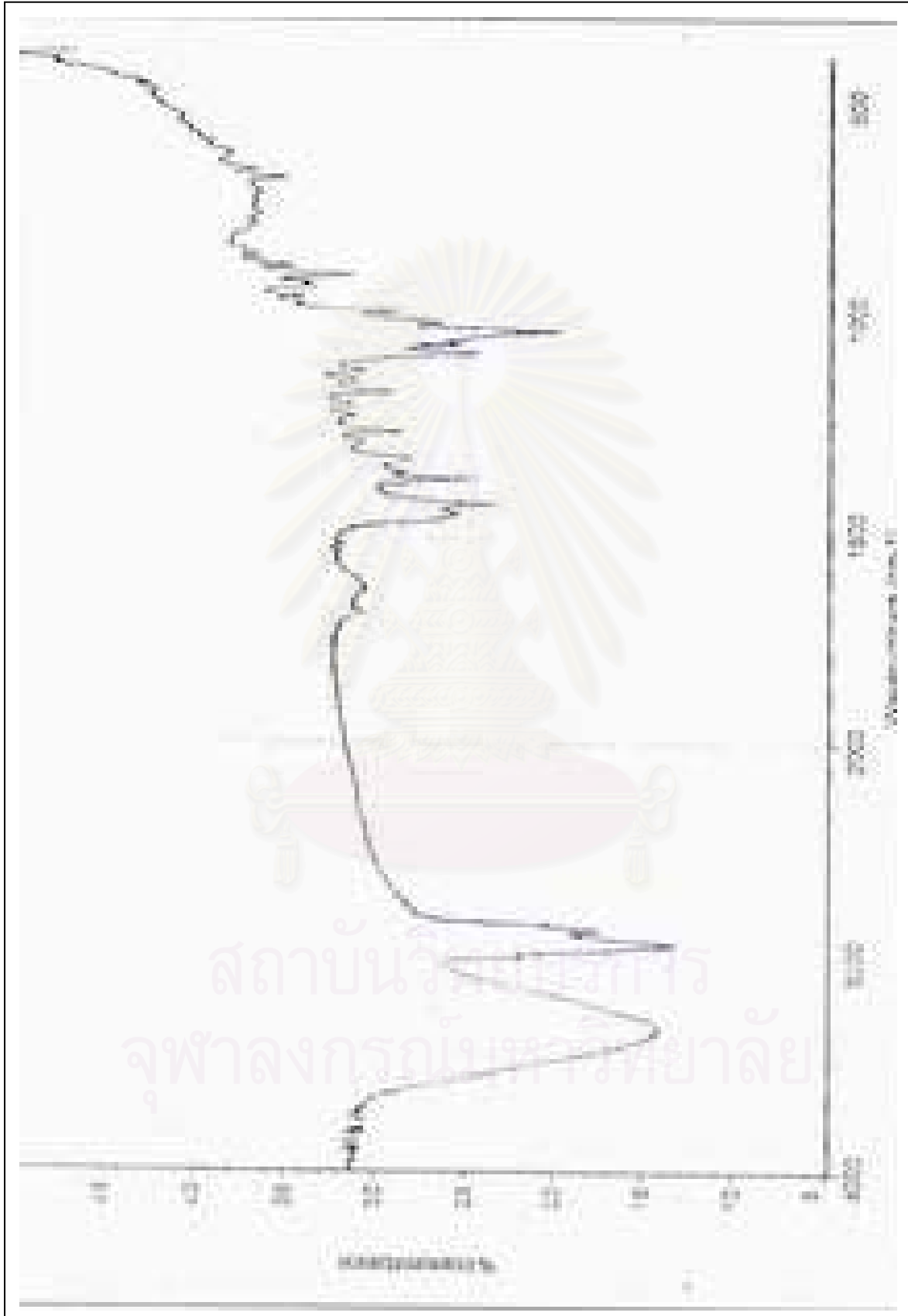
รูปที่ 24 โครงการเอ็นเอ็มอาร์ทีเปกตรัมของสาร 4



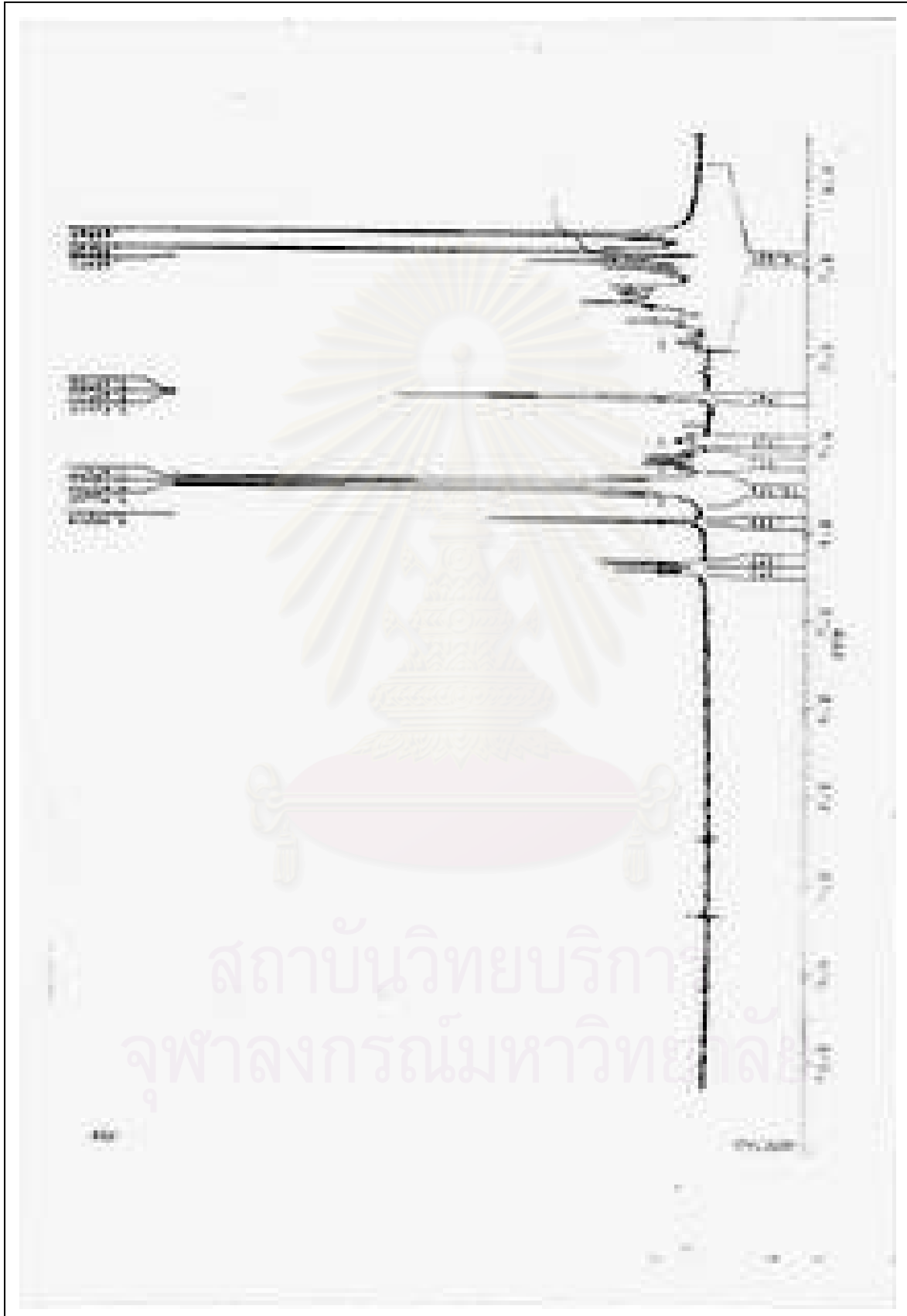
รูปที่ 25 คาร์บอน-13, DEPT-135 และ DEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4



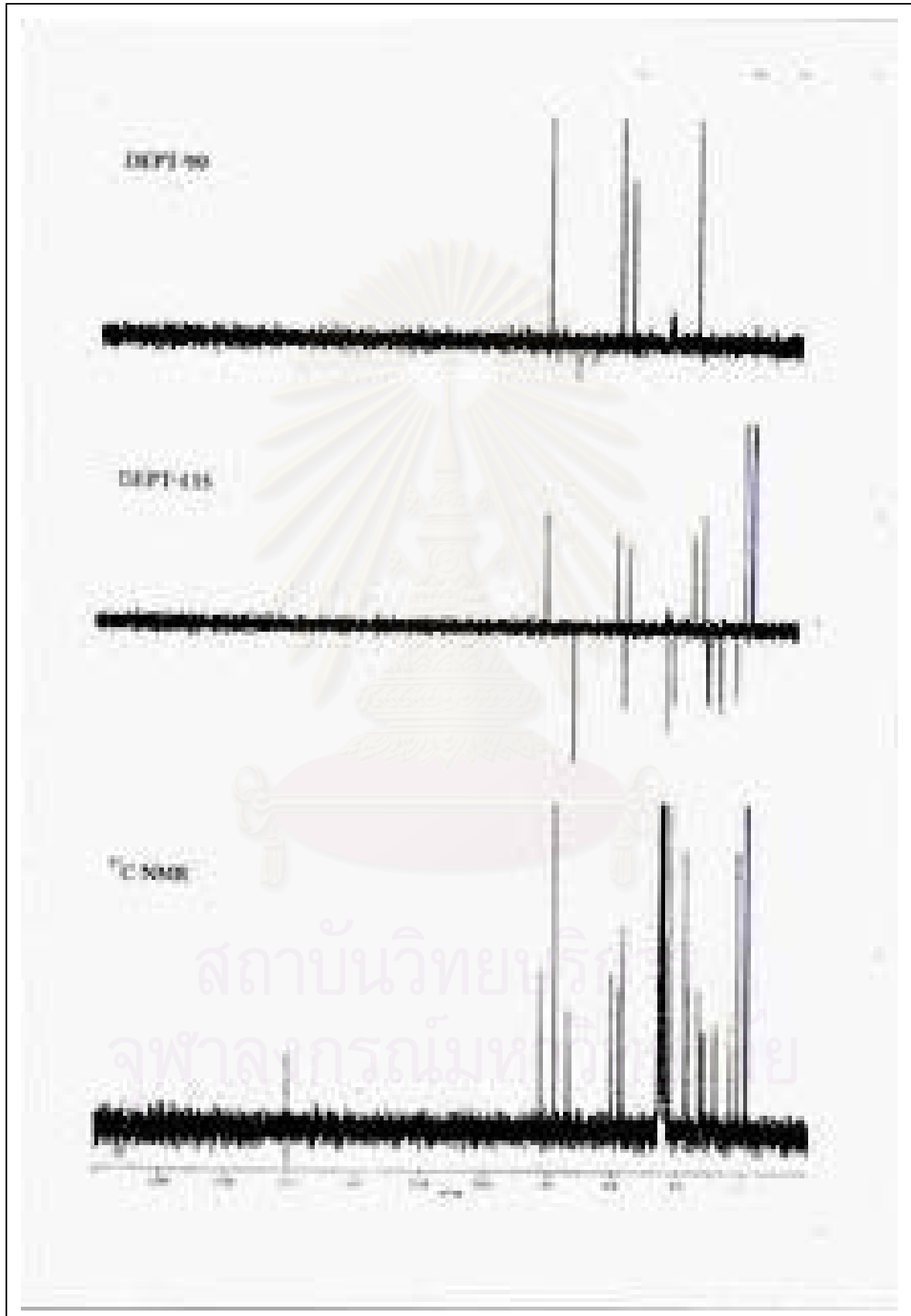
รูปที่ 18 แผนที่ปกแรกของสาร 4



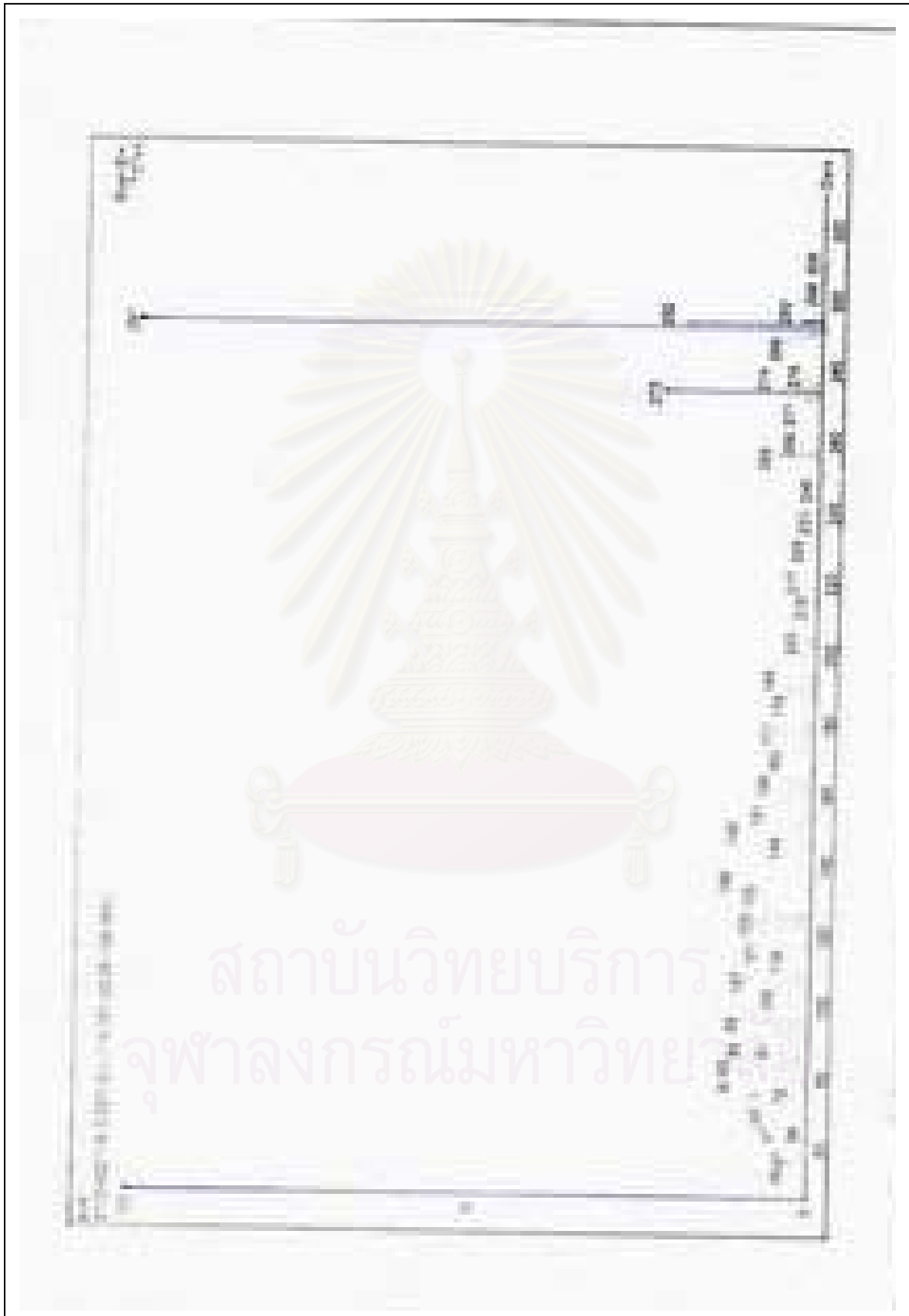
รูปที่ 27 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5



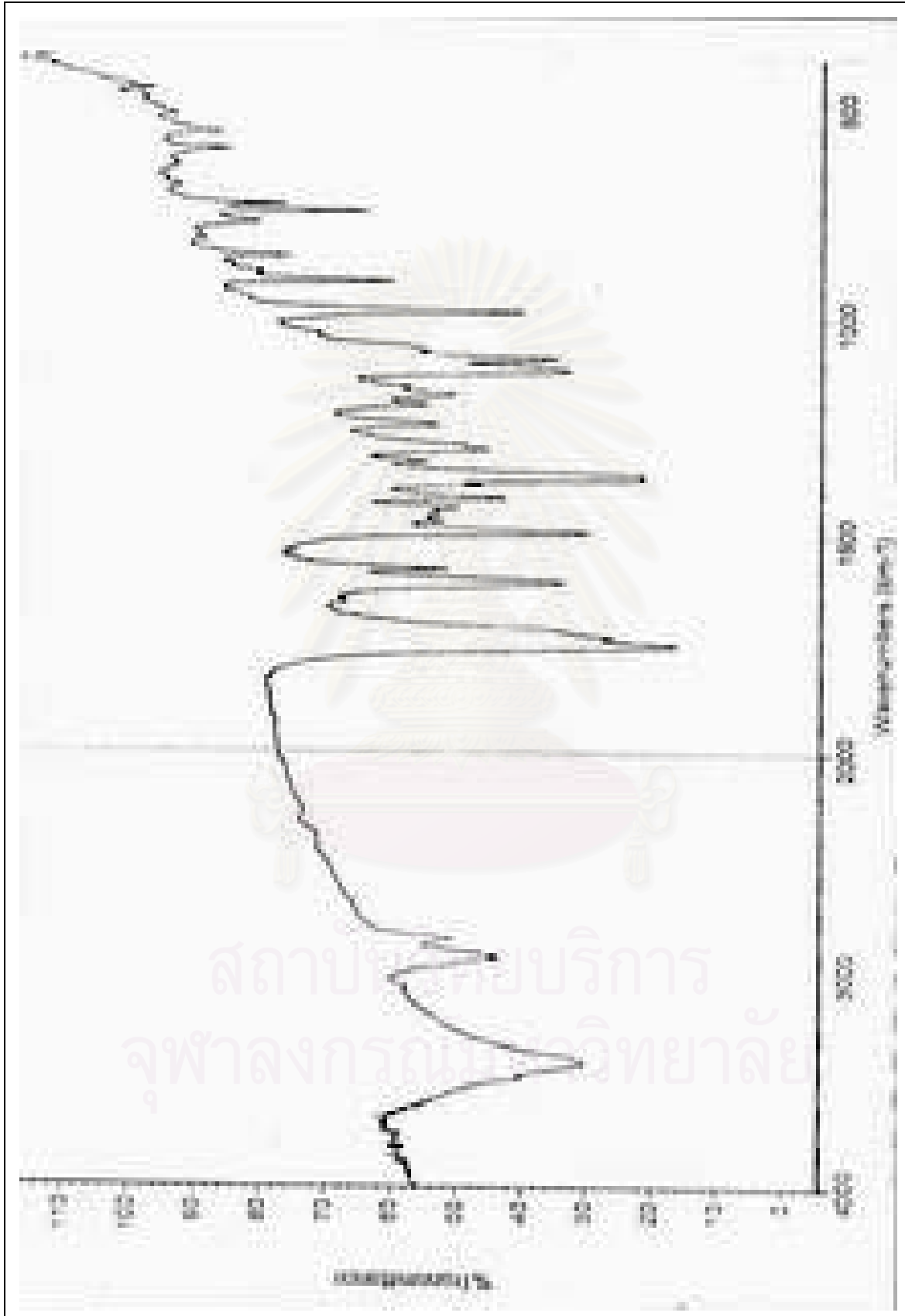
รูปที่ 28 ไปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5



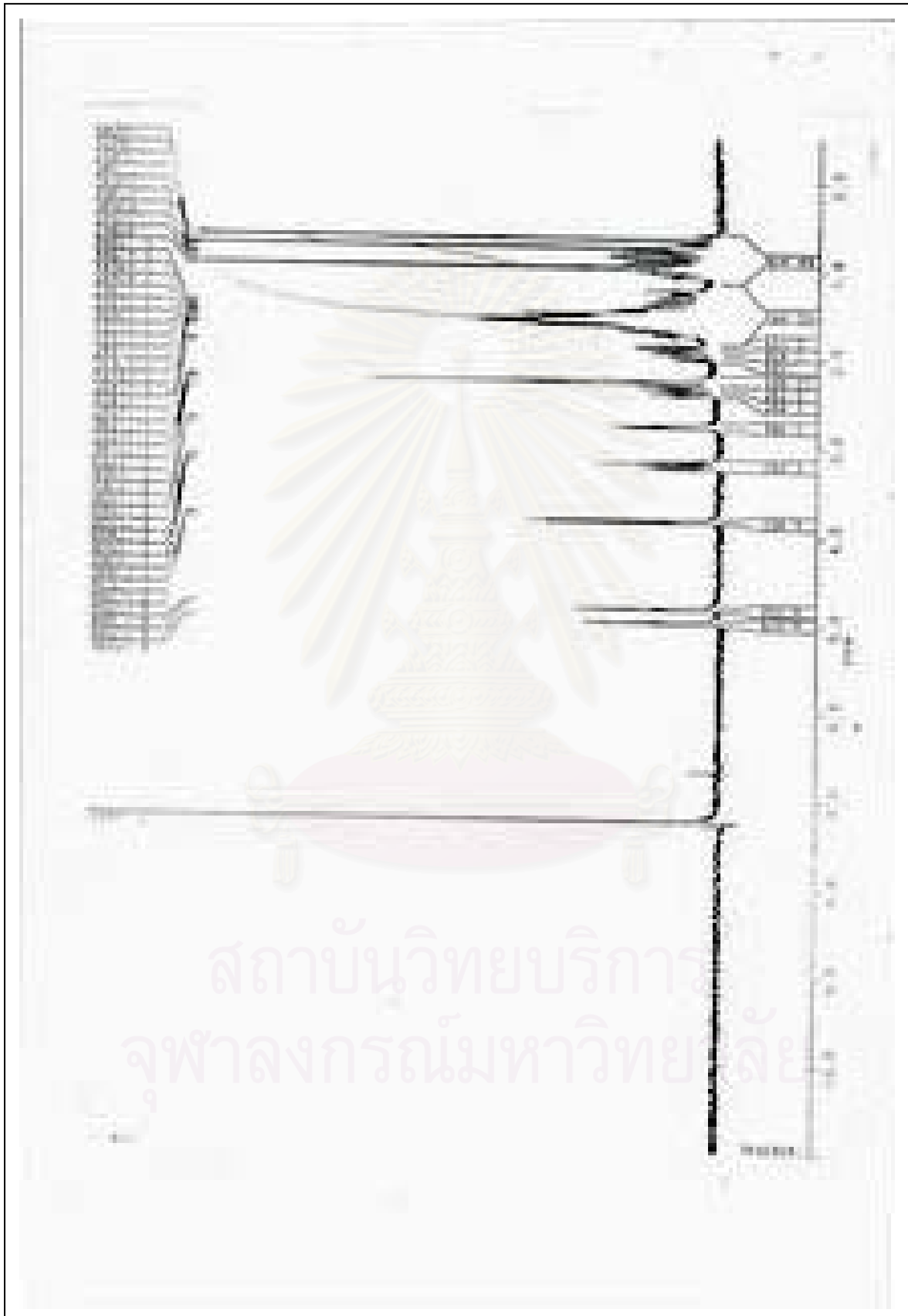
รูปที่ 29 คาร์บอน-13, DEPT-135 และ DEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5



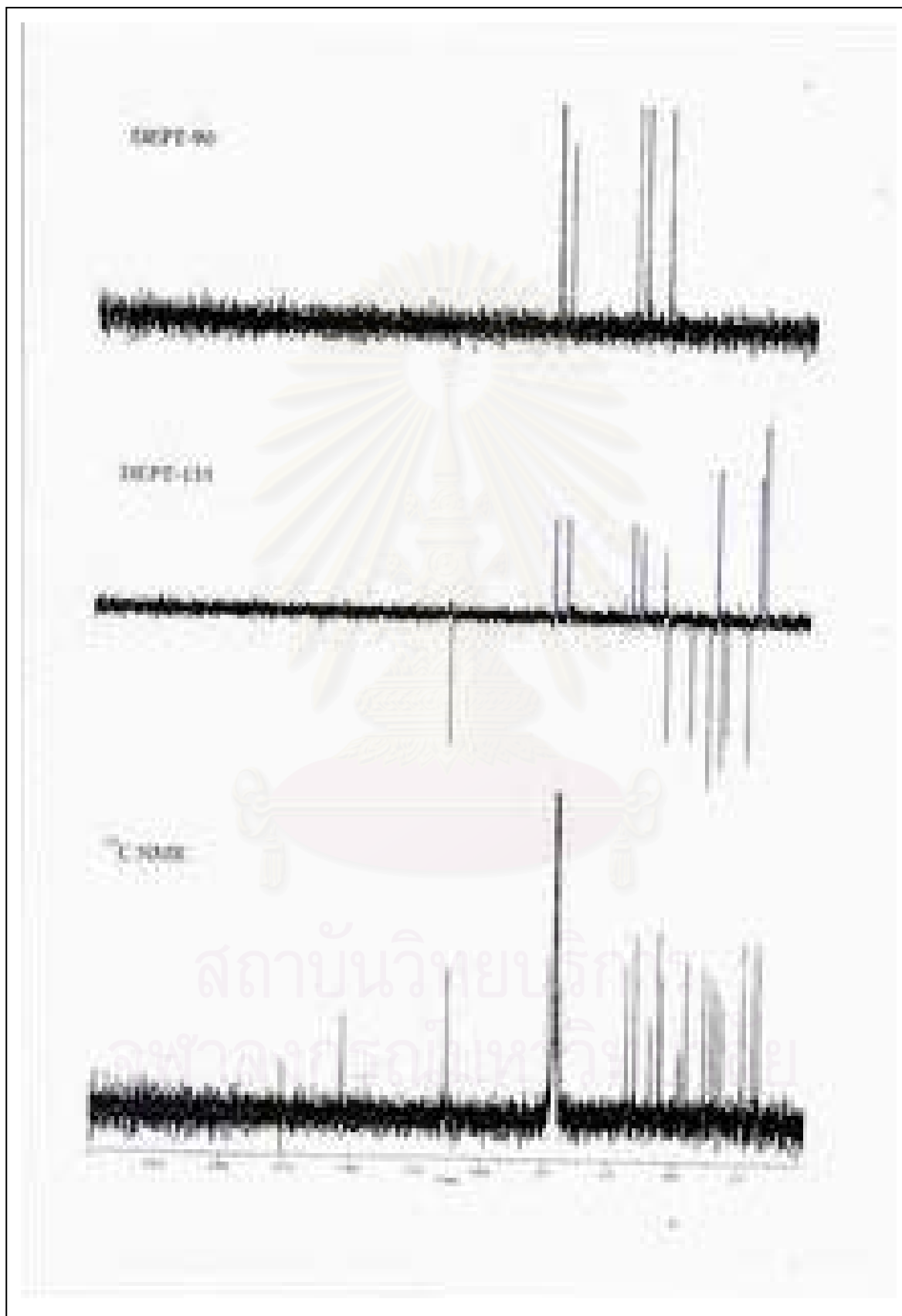
รูปที่ 30 แม่สปกตรึมของสาร 5



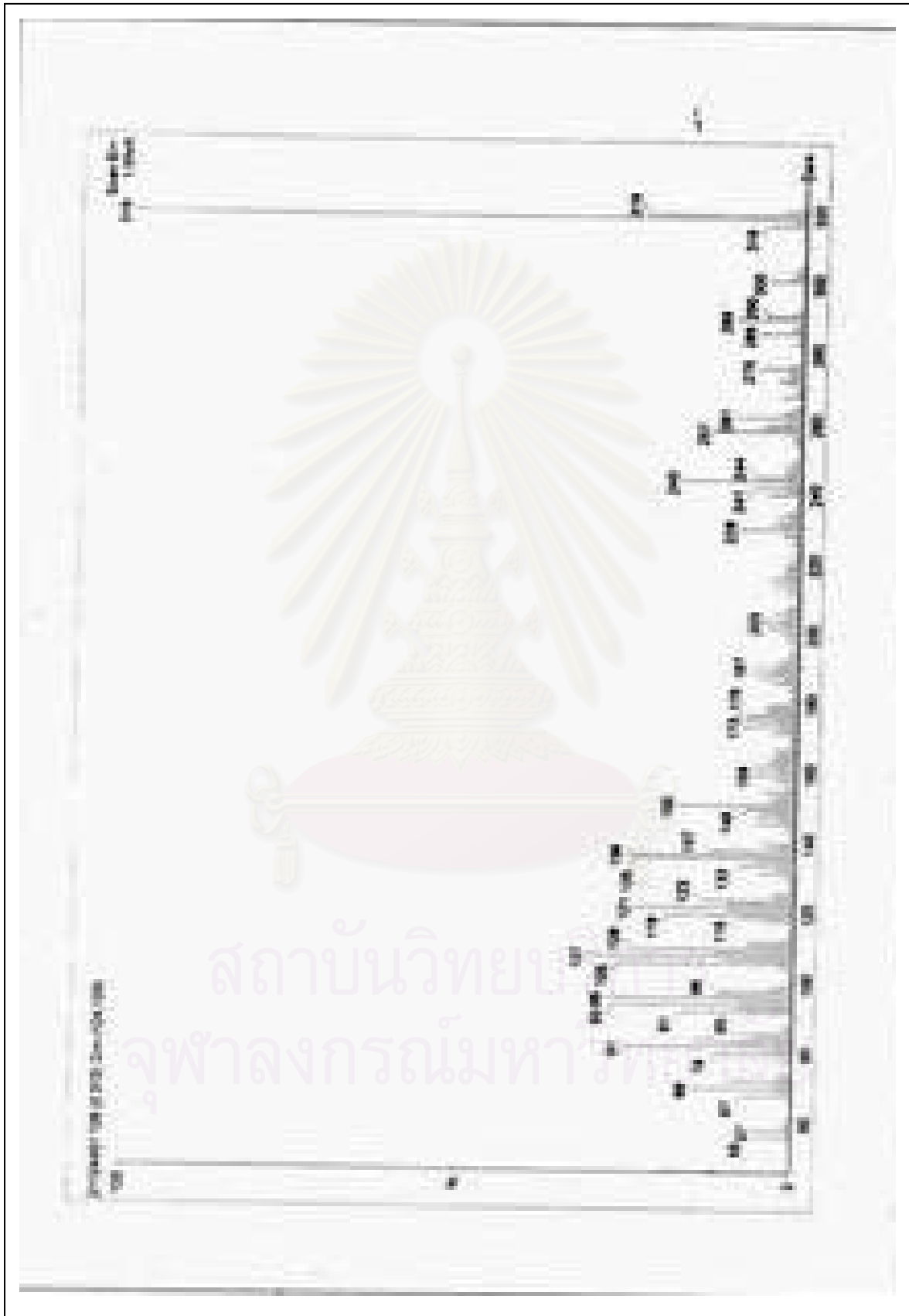
รูปที่ 31 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 6



รูปที่ 32 โปรดอนเอ็นเอ็มอาร์สปรคตรมองสาร 6



รูปที่ 33 คาร์บอน-13, DEPT-135 และ DEPT-90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 6



รูปที่ 34 แม่สปกตรัมของสาร 6

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรัชฎาภรณ์ กัลปนา เกิดเมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ.2519 ที่จังหวัดจันทบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปีการศึกษา2541 เข้ารับการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา2542 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัยในปีการศึกษา2544 และสำเร็จการศึกษาชั้นปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในปีการศึกษา 2544



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย