ไดเทอร์พีนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเปลือกเปล้าใหญ่

Diterpenes with anti-inflammatory activity from *Croton oblongifolius* barks

โดย

นางสาวญาณิศา มิตรภาพ เลขประจำตัว 5333069523

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

เรื่อง ไดเทอร์พีนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเปลือกเปล้าใหญ่

โดย นางสาวญาณิศา มิตรภาพ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา พุดหอม)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษยรัตน์ ธรรมพัฒนกิจ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดย หัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วัน.....เดือน.....พ.ศ. 2557

ชื่อโครงการ ไดเทอร์พีนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเปลือกเปล้าใหญ่

ชื่อนิสิตในโครงการ 1. นางสาวญาณิศา มิตรภาพ เลขประจำตัว 5333069523

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม

ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดแยกและพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารประเภทไดเทอร์พีนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* โดยนำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของเปลือกเปล้าใหญ่มาแยก โดยอาศัยการทดสอบฤทธิ์เป็นตัวชี้นำ (bioassay-guide fractionation) ซึ่งในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ macrophage ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ จากผลการทดลองสามารถแยกสารประเภทไดเทอร์พีนได้ 6 ชนิด และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า มีเพียงสารประกอบ **5** ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.00 μg/mL และโครงสร้างของสารสามารถพิสูจน์ทราบได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR spectrum และจากการเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum จากรายงานการวิจัยก่อนหน้า

คำสำคัญ : เปล้าใหญ่, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ไดเทอร์พีน

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Title Diterpenes with anti-inflammatory activity from *Croton oblongifolius* barks

Student Name 1. Miss Yanisa Mittraphab student id : 5333069523

Advisor Assist. Professor Dr. Khanitha Pudhom

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Years 2013

Abstract

In this research, the isolation and characterization of Diterpenes with anti-infalmmatory activity from *Croton oblongifolius* barks were performed. Bioassay-guided fractionation of its hexane crude extract on anti-inflammatory activity using nitric oxide inhibitory assay with LPS-stimulated macrophages allowed the isolation of six diterpenes. Further, the compound **5** was evaluated for its anti-inflammatory activity at various doses to determine IC_{50} values of 5.00 μg/mL. Their structures were elucidated by analysis of 1D and 2D NMR spectrum data and by comparison of those data described in the literature.

Keywords : *Croton oblongifolius*, anti-inflammatory activity, diterpenes

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา พุดหอม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยรวมทั้งการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ พี่สุพิชชา โชคไพบูลย์, พี่สุจิตรา หาญทนง, พี่ชนินทร์ สาริกภูติ และ พี่ศิวัตรา ชูเดช ที่คอยให้คำแนะนำ คอยให้การช่วยเหลือและสอนทักษะต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัยนี้ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2556 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของผู้วิจัยรวมทั้งเพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือจนงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

นางสาวญาณิศา มิตรภาพ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตารางประกอบ	ช
สารบัญรูปประกอบ	ซ
สารบัญแผนภาพประกอบ	ฌ
สารบัญภาคผนวก	ญ
คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	7
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	39
ประวัติผู้วิจัย	52

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	ข้อมูล ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) และ HMBC correlation ($CDCl_3$) ของสารประกอบ 2	28
2.	ข้อมูล ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) และ HMBC correlation ($CDCl_3$) ของสารประกอบ 4	31
3.	ข้อมูล ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) และ HMBC correlation ($CDCl_3$) ของสารประกอบ 5	33

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของต้นเปล้าใหญ่	2
2.	โครงสร้างสารประเภทไดเทอร์พีน	
3.	โครงสร้างของสารประกอบประเภทแลบเดนไดเทอร์พีน 1 - 4	4
4.	โครงสร้างของสารประกอบประเภทแลบเดนไดเทอร์พีน 5 - 7	5
5.	โครงสร้างสารประเภทเคลอโรเดนไดเทอร์พีนและ สารประเภทtrisubstituted furan	6
6.	เปอร์เซนต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ macrophage J774.A1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อทดสอบกับส่วนย่อย COC2 – COC12	24
7.	โครงสร้างของ 3,4,15,16-Diepoxy-cleroda-13(16),14-diene-12,17-olide	26
8.	โครงสร้างของ furocrotinsulolide A	27
9.	ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H - ^{1}H COSY และ HMBC ของ furocrotinsulolide A	27
10.	โครงสร้างของ(+)-Hardwickiic acid	29
11.	โครงสร้างของ 5-epi-nidoresedic acid	30
12.	ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H - ^{1}H COSY และ HMBC ของ 5-epi-nidoresedic acid	30
13.	โครงสร้างของ 8S-Kolavenol	32
14.	ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H - ^{1}H COSY และ HMBC ของ 8S-Kolavenol	32
15.	โครงสร้างของ 3α,4α:15,16-Diepoxy-13(16),14-clerodadiene	34
16.	เปอร์เซนต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ macrophage J774.A1ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อทดสอบกับสารประกอบ 1 – 6 ที่ความเข้มข้น 10 μg/mL	35
17.	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์ macrophage J774.A1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อทดสอบกับสารประกอบ 1 - 6 ที่ความเข้มข้น 10 μg/mL	36

สารบัญแผนภาพประกอบ

แผนภาพที่		หน้า
1.	แสดงการแยกสารของส่วนสกัดเฮกเซนจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่	11
2.	แสดงการแยกสารจากส่วนย่อย COC7	13
3.	แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย T6-18	14
4.	แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย T19-23	15
5.	แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC6	17
6.	แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย fr.48-63/26-37	18
7.	แสดงการแยกสารจากส่วนย่อย COC9	20
8.	แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย fr.9/23/31	21

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาคผนวก

รูปที่		หน้า
1.	แสดง ^{1}H NMR ของสารประกอบ 1	40
2.	แสดง ^{1}H NMR ของสารประกอบ 2	41
3.	แสดง ^{13}C NMR ของสารประกอบ 2	41
4.	แสดง COSY ของสารประกอบ 2	42
5.	แสดง HSQC ของสารประกอบ 2	42
6.	แสดง HMBC ของสารประกอบ 2	43
7.	แสดง ^{1}H NMR ของสารประกอบ 3	44
8.	แสดง ^{1}H NMR ของสารประกอบ 4	45
9.	แสดง ^{13}C NMR ของสารประกอบ 4	45
10.	แสดง COSY ของสารประกอบ 4	46
11.	แสดง HSQC ของสารประกอบ 4	46
12.	แสดง HMBC ของสารประกอบ 4	47
13.	แสดง ^{1}H NMR ของสารประกอบ 5	48
14.	แสดง ^{13}C NMR ของสารประกอบ 5	48
15.	แสดง COSY ของสารประกอบ 5	49
16.	แสดง HSQC ของสารประกอบ 5	49
17.	แสดง HMBC ของสารประกอบ 5	50
18.	แสดง ^{1}H NMR ของสารประกอบ 6	51

บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้

^{13}C-NMR	carbon nuclear magnetic resonance
J	coupling constant
d	doublet (NMR)
dd	doublet of doublet
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration
Hz	hertz
%	percent
^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
s	singlet (NMR)
TLC	thin layer chromatography
t	triplet (NMR)
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบันมีประชากรที่เจ็บป่วยจากโรคภัยต่างๆ มากขึ้น ทั้งนี้มีสาเหตุจาก การดำเนินชีวิตที่เปลี่ยนไป การรับประทานอาหารที่ไม่เหมาะสม หรือแม้กระทั่งสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลง เป็นต้น ทำให้มีการใช้ยารักษาโรคต่างๆ เพื่อรักษาอาการเจ็บป่วย

จากความก้าวหน้าด้านการแพทย์ และด้านวิทยาศาสตร์ นักวิจัยจำนวนมากจึงศึกษาค้นคว้า เพื่อพัฒนายารักษาโรคต่างๆ โดยยารักษาโรคนี้ต้องให้ผลการรักษาที่สูง และมีผลข้างเคียงจากการรักษาต่ำ สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งสมุนไพรเป็นยารักษาโรคต่างๆ มาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากสมุนไพรประกอบด้วยสารธรรมชาติหลายชนิด หาได้ง่าย และประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีสมุนไพรอยู่หลายชนิด และยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้ศึกษา

สมุนไพรที่เลือกใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก พบได้ทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ มีรายการการวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง การต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อราและแบคทีเรีย [1] แต่รายงานเรื่องฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเปลือกของเปล้าใหญ่ยังมีอยู่น้อยมาก งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสกัดแยกสารไดเทอร์พีนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเปลือกเปล้าใหญ่

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลทางพฤษศาสตร์ของเปล้าใหญ่

รูปที่ 1 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของต้นเปล้าใหญ่ [2]

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Croton oblongifolius* Roxb.

วงศ์ : EUPHORBIACEAE

ชื่ออื่น : เปล้าใหญ่ เปาะ ควะวู เปล้าหลวง

เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ผลัดใบ สูงประมาณ 8 เมตร

เปลือกลำต้น : เรียบ สีน้ำตาลเทา มีรอยแตกบ้างเล็กน้อย กิ่งก้านค่อนข้างใหญ่ ยอดอ่อน และช่อดอก มีเกล็ดสีเทาเป็นแผ่นเล็กๆ ปกคลุมทั่วไป

ใบ : เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนาน รูปวงรีแกมขอบขนาน รูปไข่หรือรูปใบหอก ใบลู่ลง ใบรียาว กว้าง 5-10 เซนติเมตร ยาว 9-30 เซนติเมตร ใบอ่อนสีน้ำตาล โคนใบและปลายใบแหลมหรือมน ขอบใบจะเป็นซี่ฟันไม่สม่ำเสมอ ใบแก่ค่อนข้างเกลี้ยง ก้านใบยาว 1.3-6 เซนติเมตร ฐานใบมีต่อม 2 ต่อม หลังใบเรียบสีเขียวเข้ม ท้องใบมีขนไม่มาก ใบแก่เปลี่ยนเป็นสีส้มก่อนร่วงหล่น

ดอก : เป็นดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง หลายช่อ ช่อดอกยาว 12-22 เซนติเมตร ตั้งตรง ดอกแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน หรือแยกต้น ดอกย่อยมีขนาดเล็ก กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียว ทยอยบานจากโคนช่อไปหาปลาย ดอกตัวผู้สีขาวใส กลีบดอกสั้นมี 5 กลีบ โคนกลีบดอกติดกัน มีกลีบเลี้ยงรูปขอบขนานกว้างๆ 5 กลีบ หลังกลีบเลี้ยงมีเกล็ดสีน้ำตาล กลีบดอกยาวเท่ากับกลีบเลี้ยง มีขนหนาแน่นที่ฐานดอกมีต่อมกลมๆ 5 ต่อม เกสรตัวผู้มี 12 อัน เกลี้ยง ดอกตัวเมียสีเหลืองแกมเขียว กลีบดอกมี 5 กลีบ กลีบดอกเล็กรูปยาวแคบ ขอบกลีบมีขน โคนกลีบดอกติดกัน ปลายกลีบดอกแหลม กลีบเลี้ยงรูปขอบขนาน รังไข่รูปขอบขนาน มีเกล็ด

ผล : ผลแห้งแตก รูปทรงกลมแบน มี 3 พู ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ผิวเรียบด้านบนแบน มีเกล็ดเล็กๆ ห่างกัน ผลอ่อนสีเขียว ผลอ่อนใช้ย้อมผ้า ผลแก่รับประทานได้ พบตามป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง

สรรพคุณทางยา[1]

ราก : เป็นยาระบาย แก้พิษตานซาง ถ่ายเสมหะ ขับผายลม ทำให้ถ่ายอุจจาระ แก้ปวดตามข้อ แก้ปวดกระดูก

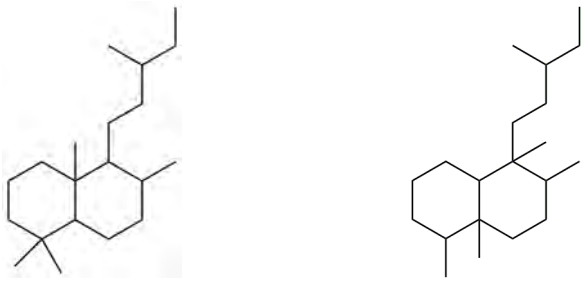
เถา : แก้ตานขโมย ถอนพิษสำแดง ขับลม

ใบ : เป็นยาระบาย

ต้น : เป็นยาระบาย แก้อาการเกร็ง ขับพยาธิ ระบายพิษไข้

<u>ไดเทอร์พีน</u>[3]

ไดเทอร์พีนเป็นสารธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และสามารถพบได้ในเปล้าใหญ่ ซึ่งไดเทอร์พีนเกิดจากไอโซพรีน 2 หน่วยต่อกัน ประกอบด้วยคาร์บอน 20 อะตอม ประเภทของไดเทอร์พีนมีหลายประเภท เช่น แลบเดนไดเทอร์พีน, เคลอโรเดนไดเทอร์พีน เป็นต้น โดยมีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{38}$ และมีโครงสร้างดังรูปที่ 2

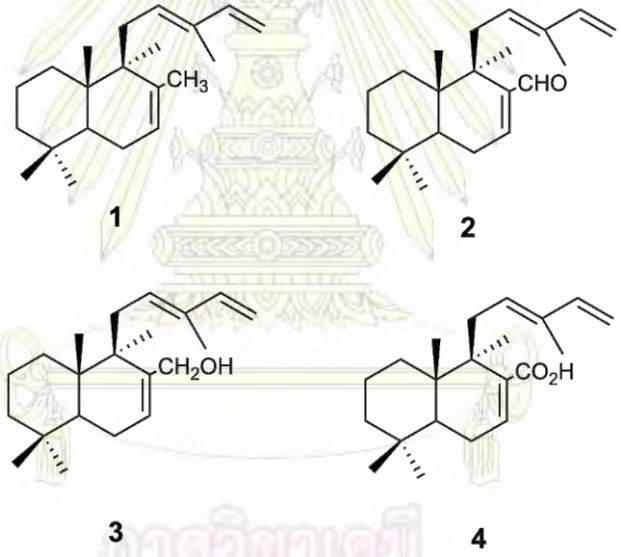


1 2

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของแลบเดนไดเทอร์พีน (1) และเคลอโรเดนไดเทอร์พีน (2)

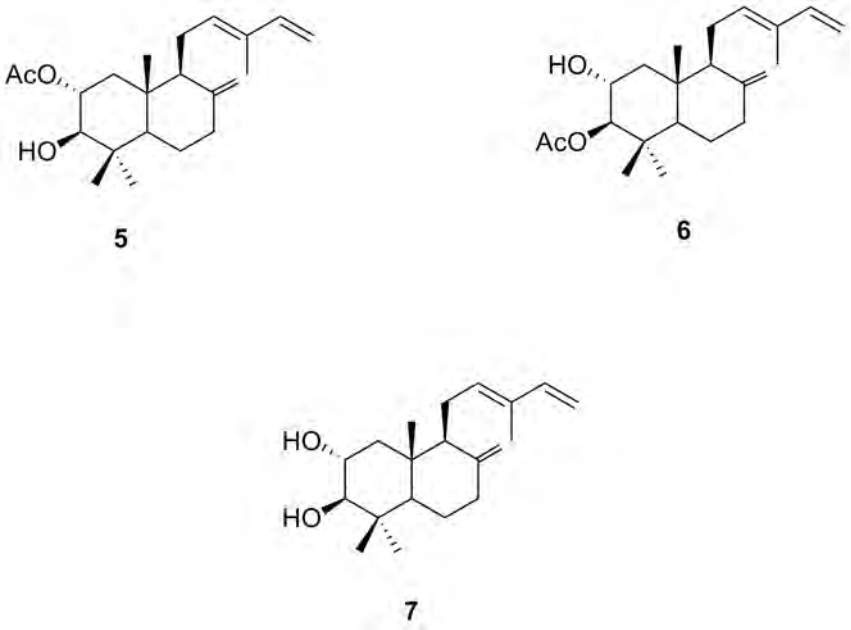
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1999 Roengsumran S. และคณะ[4] สกัดสารธรรมชาติจากเปลือกเปล้าใหญ่ *C. oblongfolius* พบสารประเภท labdane diterpenes ชนิดใหม่ 4 ชนิด คือ labda-7,12(E),14-triene **1**, labda-7,12(E),14-triene-17-al **2**, labda-7,12(E),14-triene-17-ol **3** และ labc 4 7,12(E),14-triene-17-oic **4** (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างสารประเภทแลบเดนไดเทอร์พีน 1 - 4

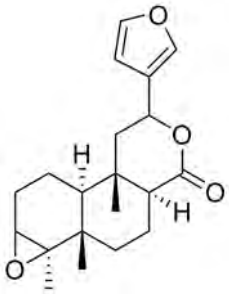
ในปี 2001 Roengsumran S. และคณะ[5] สกัดสารธรรมชาติจากส่วนเปลือกของเปล้าใหญ่ *C. oblongifolius* พบว่าได้สารประเภทแลบเดนไดเทอร์พีน 3 ชนิด คือ 2-acetoxy-3-hydroxy-labda-8(17),12(E)-14-triene **5**, 3-acetoxy-2-hydroxy-labda-8(17),12(E)-14-triene **6** และ 2,3-dihydroxy-labda-8(17),12(E),14-triene **7** (รูปที่ 4) และได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า สารประกอบ 5 และ 6 สามารถต้านมะเร็งได้ในระดับปานกลาง



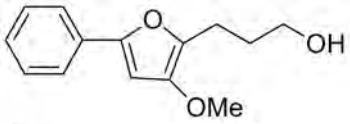
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างสารประกอบประเภทแลบเดนไดเทอร์พีน 5 - 7

ในปี 2011 Pudhom K. และคณะ[6] สกัดสารธรรมชาติจากส่วนเปลือกของเปล้าใหญ่ *C. oblongifolius* พบว่าได้สารใหม่ประเภทเคลอโรเดนไดเทอร์พีน คือ 3,4,15,16-diepoxy-cleroda-13(16),14-diene-12,17-olide (รูปที่ 5) และ trisubstituted furan คือ 3(3'-methoxy-5'-phenylfuran-2'-yl)propan-1-ol (รูปที่ 5) และสารธรรมชาติอีก 6 ชนิด ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



8



9

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างสารประเภทเคลอโรเดนไดเทอร์พีน (8) และ สารประเภทtrisubstituted furan (9)

ในปี 2012 Salman K. และคณะ[7] นำสารธรรมชาติ 15,16-epoxy-3**α**-hydroxylabda-8,13(16),14-trien-7-one มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการกระตุ้นด้วย LPS โดยใช้เซลล์ RAW 264.7 macrophages เพื่อดูการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2

วัตถุประสงค์

1. แยกสารประกอบประเภทไดเทอร์พีนจากเปลือกเปล้าใหญ่ *C. oblongifolius*
2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยเทคนิคสเปกโตรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบโครงสร้างของสารและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารที่ทำการสกัดได้จากเปลือกเปล้าใหญ่ *C. oblongifolius*

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. <u>วัตถุดิบ</u>

เปลือกเปล้าใหญ่แห้ง *C. oblongifolius* หนัก 2 กิโลกรัม เก็บในเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

2. <u>วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

2.1 วัสดุอุปกรณ์พื้นฐานภายใน

บีกเกอร์	หลอดคาปิลารี
หลอดทดลอง	กระบอกตวง
กระจกนาฬิกา	ขวดรูปกรวย
สำลี	แท่งแก้วคนสาร
Vial	ช้อนตักสาร
กรวยแก้ว	ขวดก้นกลม
กรวยแยก	หลอดหยด
TLC Aluminium sheets silica sel 60	คอลัมน์โครมาโทกราฟี
กรวยบุ๊คเนอร์	กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
Multichannel microplate	

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1) เครื่อง Evaporator รุ่น Eyela rotary evaporator N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., LTD และ รุ่น Buchi rotavapor R-114, Switzerland
2) เครื่องชั่งน้ำหนักรุ่น Sartorrius Basic ของบริษัท Scientific promotion Co.,LTD
3) Diaphram pump (Büchi Vac® V-500, Switzerland)
4) ตู้อบ (MEMERTUM 500, BEC, Thailand)

5) Sonicator (Branson, USA)

6) Safety Laboratory Hood (Asia chemical and engineering Co.,LTD., Thailand)

7) Nuclear Magnetic Resonaces Spectroscometer YH 400 ของบริษัท Oxford

8) Microplate reader ยี่ห้อ BIOTEK รุ่น POWERWAVE XS2

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการแยกสารบริสุทธิ์

- ซิลิกาเจล เบอร์ 9385 และเบอร์ 7734 จากบริษัท Merck
- ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต, อะซิโตน และเมทานอล
- Aluminium molybdate ใน 5% H_2SO_4 ในเอทานอล เป็นสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์บนแผ่น TLC เพื่อให้เห็นเป็นจุดสารบนแผ่น TLC ได้ชัดเจน

3.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ NMR Spectrophotometer: $CDCl_3$ (Chloroform D)

3.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Griess reagent
- 1 % Sulfanilamide
- *N*-1-napthylethylenediamine dihydrochloride

3.4 เซลล์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

- Murine macrophage J774.A1

4. เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

4.1 คอลัมน์โครมาโทรกราฟี (Column Chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร โดยอาศัยความสามารถในการถูกดูดซับที่ไม่เท่ากันของสารบนวัฏภาคนิ่ง (Stationary Phase) เช่น ซิลิกาเจล ซึ่งจะบรรจุตัววัฏภาคนิ่งลงในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดพอเหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยวิธีเปียก (wet packing) แล้วทำการบรรจุสารผสมที่ต้องการแยก ซึ่งสารผสมจะผ่านคอลัมน์ช้าๆ และใช้

ตัวทำละลายผสมหรือที่เรียกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่เหมาะสม ในการแยกสารโดยจะเป็นตัวพาสารให้เคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับในคอลัมน์ เกิดการแยกเป็นแถบสาร แล้วทำการเก็บส่วนย่อยที่แยกได้

4.2 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ในการแยกสาร โดยใช้ TLC Aluminium Sheets Silica Gel 60 F_{254} ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วระบุระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ หลังจากนั้นนำหลอดแคปิลารีขนาดเล็กแต้มสารลงไปบนแผ่น TLC โดยเว้นระยะห่างระหว่างจุดแต้มประมาณ 0.5 cm นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรอง และมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุด Solvent front ที่กำหนดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC ให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารที่เคลื่อนที่ไป โดยการนำไปฉายแสง UV (ความยาวคลื่น 256 nm) ก่อนนำไปจุ่มในสารละลาย Ammonium molybdate, 5% H_2SO_4 จากนั้นนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนโดย Hot Plate ประมาณ 1-2 นาที ทำการบันทึกตำแหน่งของจุดที่เกิดขึ้น

4.3) โครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดโมเลกุล (Size Exclusion Chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารตามน้ำหนักของโมเลกุล โดยตัวดูดซับ เช่น Sephadex LH20 โดยบรรจุลงไปในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางพอเหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการทำการแยก โดยวิธีเปียก (Wet Packing) และทำการบรรจุสารผสมที่ต้องการแยก ซึ่งสารผสมจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์อย่างช้า ๆ และใช้ตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกเป็นตัวพาสารเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซันในคอลัมน์ จะเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้นหลังจากนั้นเก็บส่วนของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยที่สารที่น้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ก่อน

<u>5. ขั้นตอนการทำการทดลอง</u>

5.1 ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัด

5.1.1 นำเปลือกของต้นเปล้าใหญ่ที่ผ่านการตากแห้งและทำการบดละเอียดแล้วทั้งหมด 2 กิโลกรัม นำไปแช่เฮกเซนจำนวน 3 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

5.1.2 กรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกไป โดยใช้ Rotary Vacuum Evaporator จะได้ส่วนสกัดเฮกเซนหนัก 43.7 กรัม

5.2 ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดต่าง ๆ ของเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

5.2.1 การแยกสารจากส่วนสกัดเฮกเซนของเปลือกเปล้าใหญ่ (แผนภาพที่ 1)

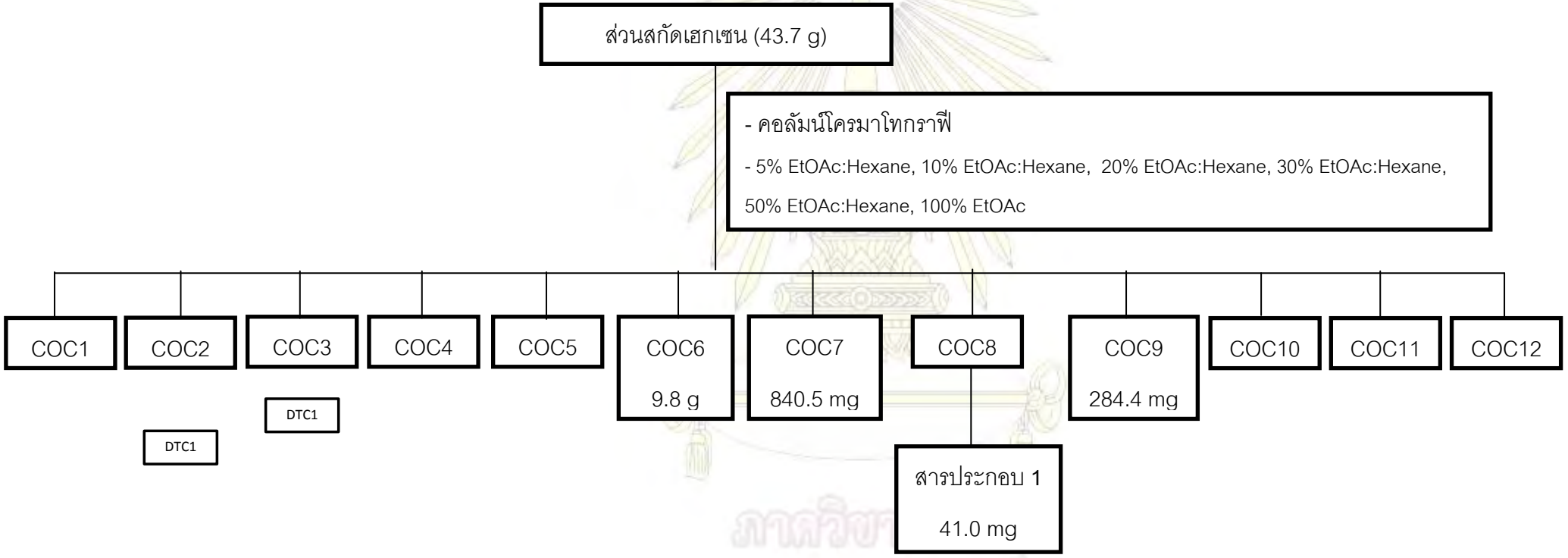
1.) แบ่งส่วนสกัดเฮกเซนมาเล็กน้อย มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการหาระบบของตัวทำละลายผสมหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่จะทำการลงคอลัมน์เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยอาศัยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

2.) นำส่วนสกัดเฮกเซนทั้งหมด มาทำ Quick Column โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่งด้วยระบบตัวทำละลายของเอทิลอะซิเตตและเฮกเซนในสัดส่วนตั้งแต่ 5%-100% และท้ายสุดเป็นระบบเอทิลอะซิเตต (100%)

3.) เก็บส่วนย่อยที่ออกมาจากคอลัมน์ นำมาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC แล้วนำส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันมารวมกัน และระเหยตัวทำละลายออก ซึ่งจะได้ 12 ส่วนย่อย (COC1-COC12) ดังแผนภาพที่ 1 และได้ของแข็งสีขาวตกตะกอนออกมา ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด (สารประกอบ **1**)

4.) นำส่วนย่อย COC2-COC12 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบตามวิธีการตอนที่ 3 พบว่าส่วนย่อย COC6, COC7, COC9 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับที่ยอมรับได้ ร่วมกับการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีอย่างคร่าวด้วยเทคนิค ^{1}H NMR จึงนำส่วนย่อยเหล่านี้มาแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 1 : แสดงการแยกสารของส่วนสกัดเฮกเซนจากเปลือกเปล้าใหญ่ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

5.2.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC8 (แผนภาพที่ 1)

เนื่องจากส่วนย่อย COC8 เกิดของแข็งสีขาวขึ้น จึงทำกรองแยกของแข็ง ได้สารประกอบ **1** เป็นสารบริสุทธิ์ และนำสารประกอบ **1** ที่แยกได้มาทำการหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR spectroscopy

5.2.3 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC7 (แผนภาพที่ 2, 3 และ 4)

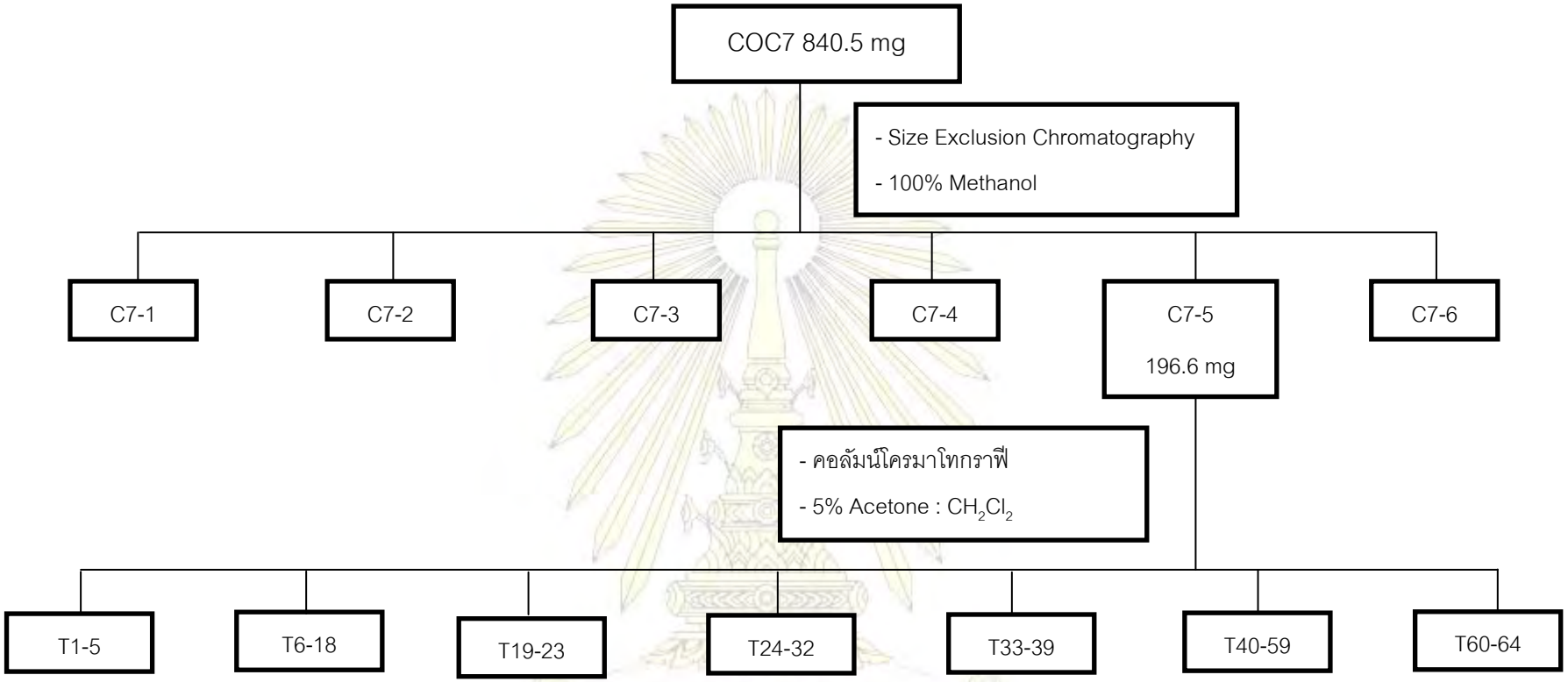
1.) นำส่วนย่อย COC7 ทั้งหมด 840.5 มิลลิกรัม มาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Size Exclusion Chromatography โดยใช้ Sephadex LH20 เป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

2.) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยที่แยกจากส่วนย่อย COC7 โดยใช้เทคนิค TLC และทำการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกัน ดังแผนภาพที่ 2

3.) เลือกส่วนย่อยของ C7-5 โดยพิจารณจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ 5% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกส่วนย่อยจาก C7-5 ได้เป็น 7 ส่วน ดังแผนภาพที่ 2

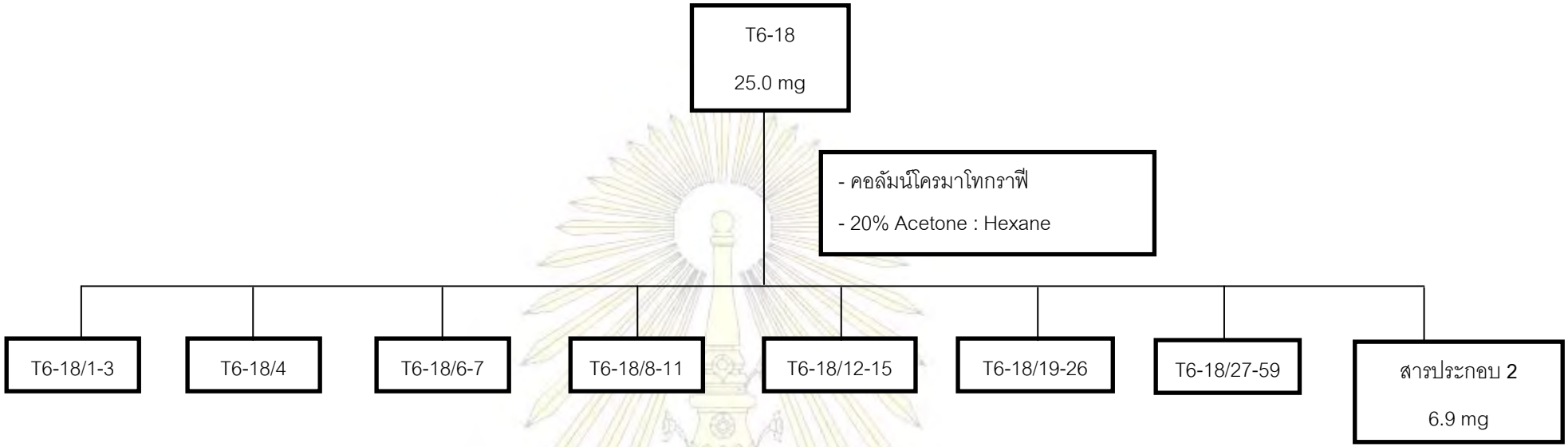
4.) เลือกส่วนย่อยของ T6-18 โดยพิจารณาจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ 20% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกส่วนย่อยจาก T6-18 ได้เป็น 8 ส่วน ดังแผนภาพที่ 3 ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด (สารประกอบ **2**)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 2 : แสดงการแยกสารจากส่วนย่อย COC7

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



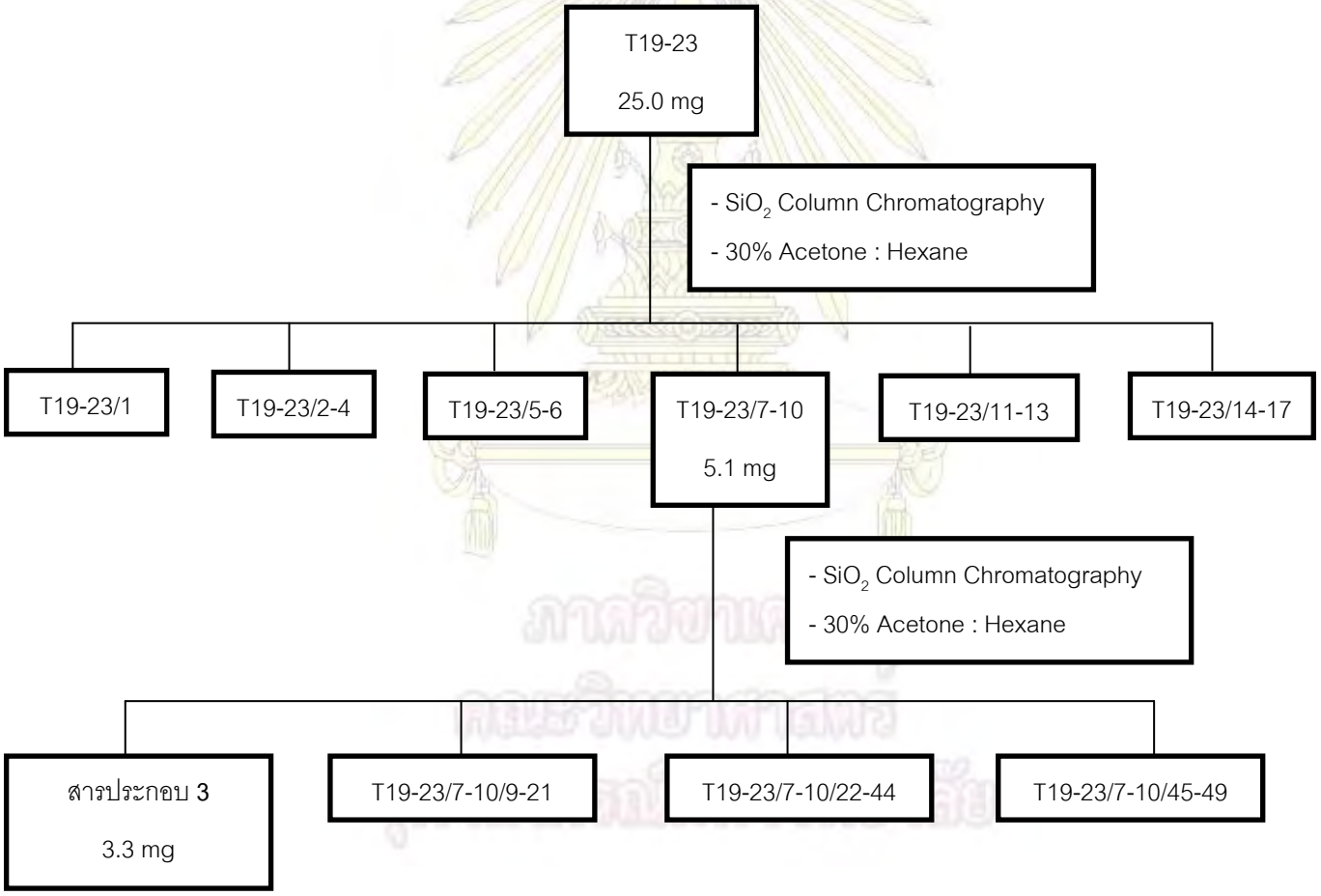
แผนภาพที่ 3 : **แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย** T6-18

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.) เลือกส่วนย่อยของ T19-23 โดยพิจารณาจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ 30% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกส่วนย่อยจาก T19-23 ได้เป็น 6 ส่วน ดังแผนภาพที่ 4

6.) เลือกส่วนย่อยของ T19-23/7-10 โดยพิจารณาจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ 30% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกส่วนย่อยจาก T19-23/7-10 ได้เป็น 4 ส่วน ดังแผนภาพที่ 4

7.) นำสารประกอบ **2** และสารประกอบ **3** ที่แยกได้มาทำการหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR spectroscopy



แผนภาพที่ 4 : **แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย** T19-23

5.2.4 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC6 (แผนภาพที่ 5 และ 6)

1.) ทำการหาระบบของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม โดยแบ่งส่วนย่อย COC6 มาเล็กน้อยละลายในตัวทำละลาย จุดบนแผ่น TLC และดูแถบสารที่เกิดขึ้น

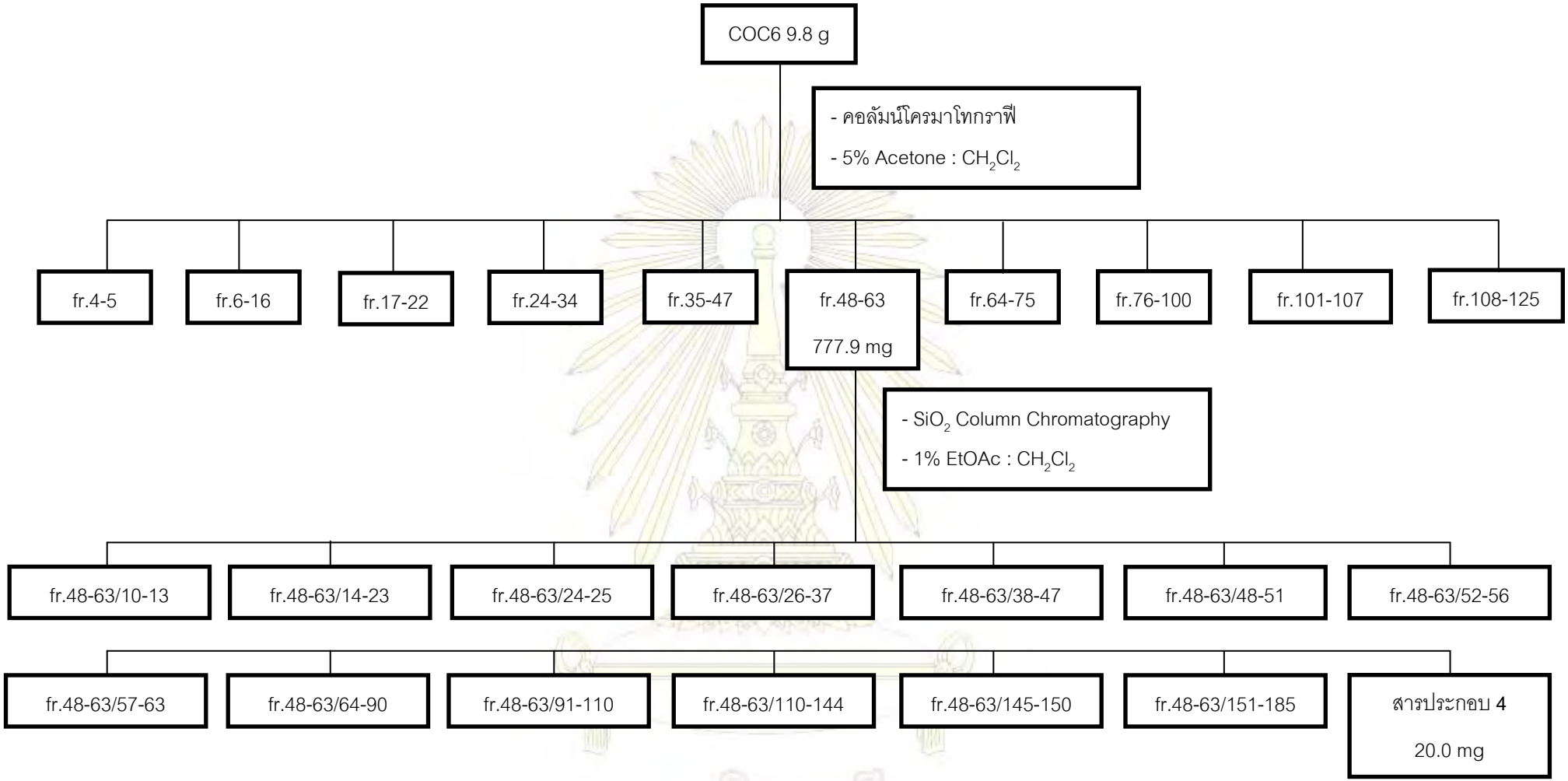
2.) นำส่วนย่อย COC6 ทั้งหมด 9.8 กรัม มาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 5% อะซิโตนในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

3.) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยที่แยกจากส่วนย่อย COC6 โดยใช้เทคนิค TLC และทำการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกัน ทำให้แยกส่วนย่อยจาก COC6 ได้เป็น 10 ส่วน ดังแผนภาพที่ 5

4.) นำส่วนย่อย fr.48-63 มาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 1% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

5.) เก็บส่วนย่อยจากส่วน fr.48-63 และรวมส่วนย่อยจาก fr.48-63 โดยตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันจากเทคนิค TLC ทำให้รวมส่วนย่อยจาก fr.48-63 เป็น 14 ส่วน ดังแผนภาพที่ 5 ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด (สารประกอบ **4**)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



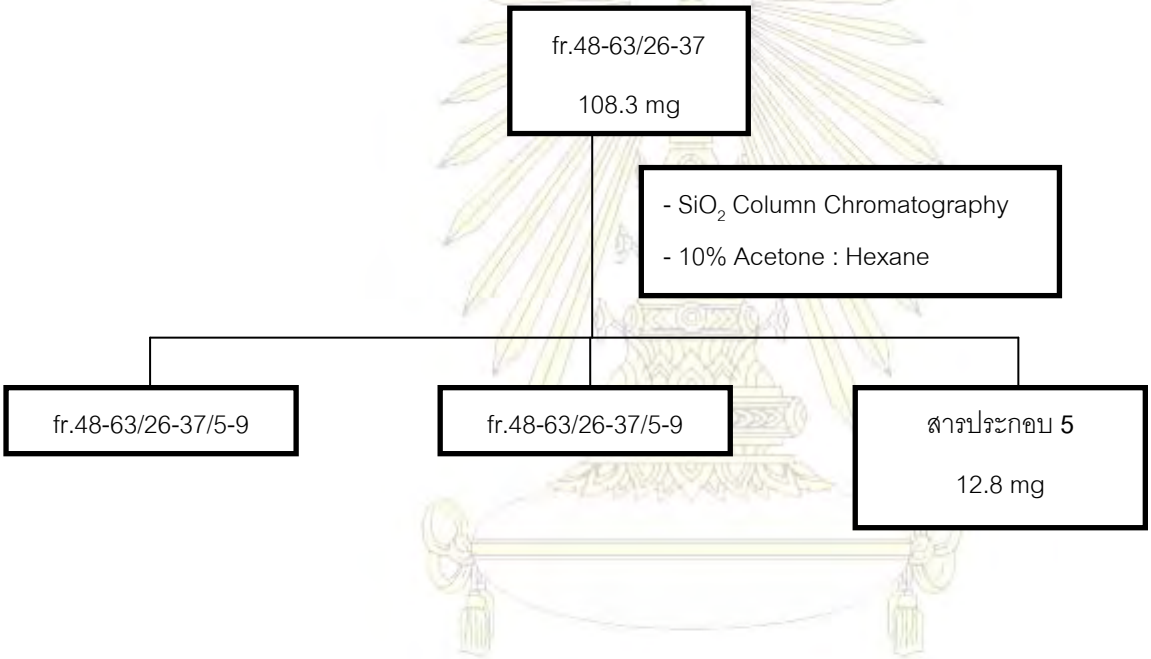
แผนภาพที่ 5 : **แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย** COC6

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.) นำส่วนย่อย fr.48-63/26-37 โดยพิจารณาจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 10% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

7.) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยที่แยกจากส่วนย่อย fr.48-63/26-37 โดยใช้เทคนิค TLC และทำการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกัน ทำให้แยกส่วนย่อยจาก fr.48-63/26-37 ได้เป็น 3 ส่วน ดังแผนภาพที่ 6 ได้สารประกอบ **5** เป็นสารบริสุทธิ์

8.) นำสารประกอบ **4** และสารประกอบ **5** ที่แยกได้มาทำการหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR spectroscopy



แผนภาพที่ 6 : **แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย** fr.48-63/26-37

5.2.5 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC9 (แผนภาพที่ 7 และ 8)

1.) ทำการหาระบบของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม โดยแบ่งส่วนย่อย COC9 มาเล็กน้อยละลายในตัวทำละลาย จุดบนแผ่น TLC และดูแถบสารที่เกิดขึ้น

2.) นำส่วนย่อย COC9 ทั้งหมด 248.4 มิลลิกรัม มาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 5% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

3.) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยที่แยกจากส่วนย่อย COC9 โดยใช้เทคนิค TLC และทำการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกัน ทำให้แยกส่วนย่อยจาก COC9 ได้เป็น 6 ส่วน ดังแผนภาพที่ 7

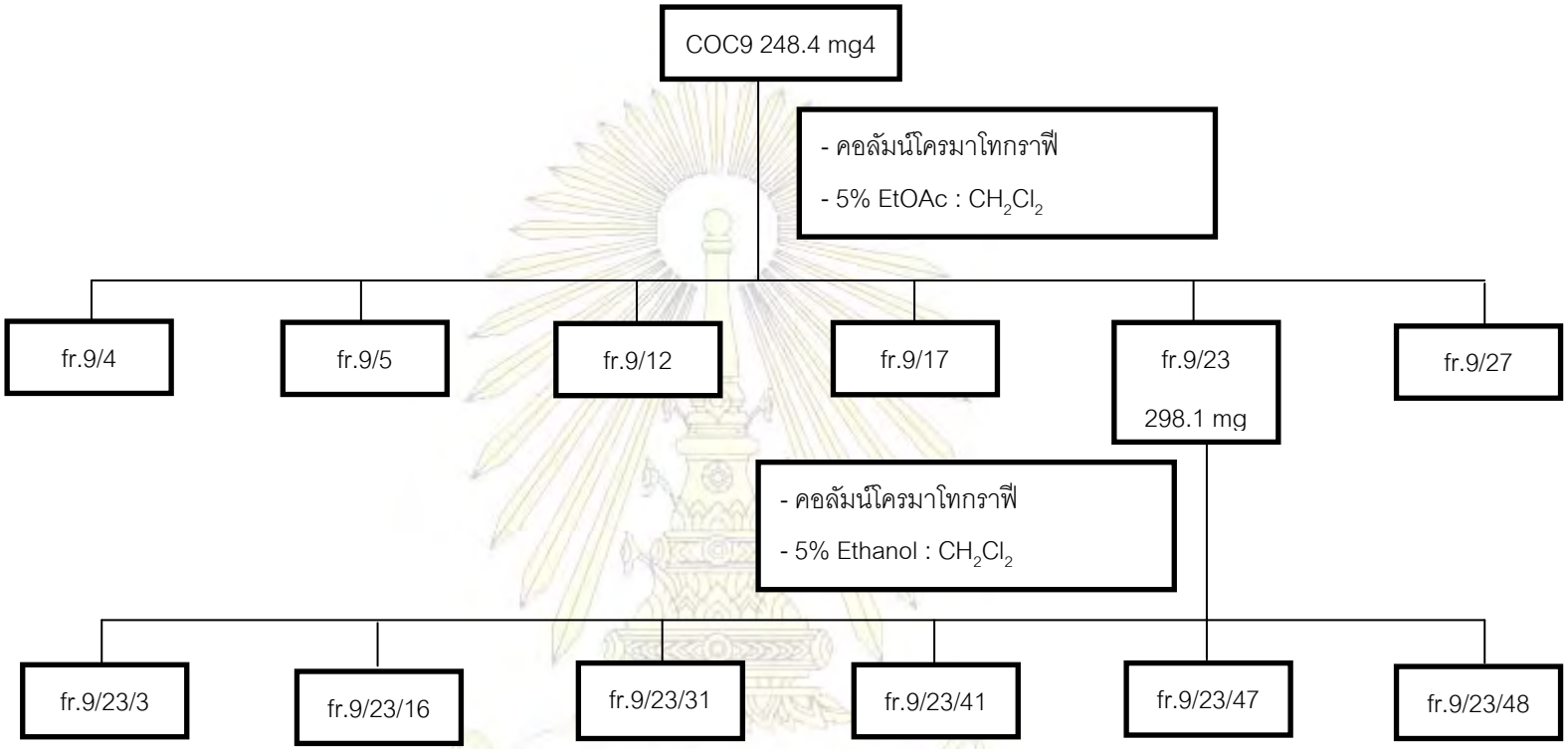
4.) นำส่วนย่อย fr.9/23 โดยพิจารณาจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

5.) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยที่แยกจากส่วนย่อย fr.9/23 โดยใช้เทคนิค TLC และทำการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกัน ทำให้แยกส่วนย่อยจาก fr.9/23 ได้เป็น 6 ส่วน ดังแผนภาพที่ 7

4.) นำส่วนย่อย fr.9/23/31 โดยพิจารณาจาก NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

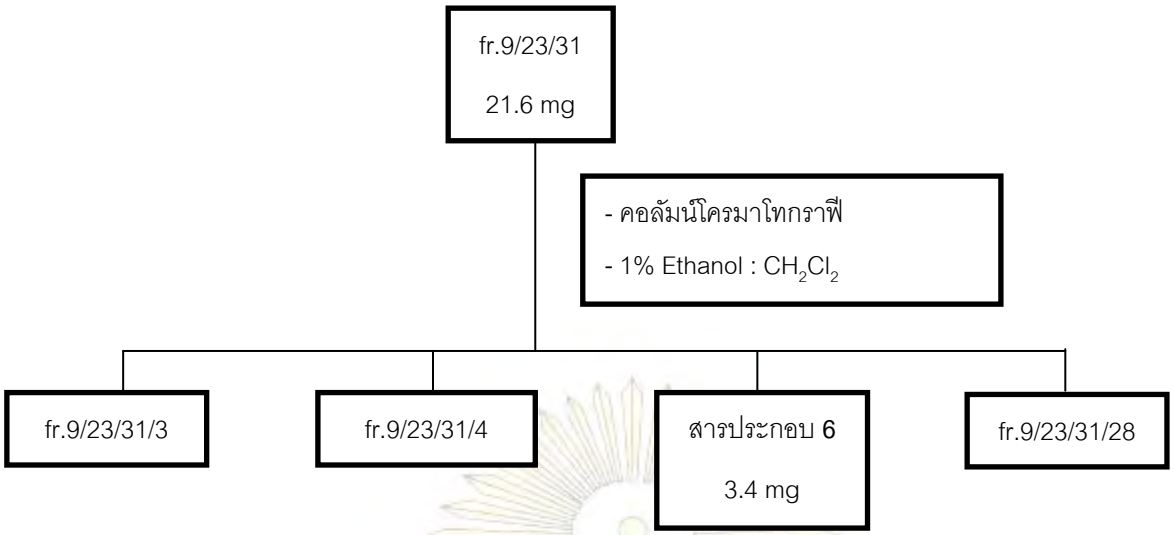
5.) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อย fr.9/23/31 โดยใช้เทคนิค TLC และทำการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกัน ทำให้แยกส่วนย่อยจาก fr.9/23/31 ได้เป็น 4 ส่วน ดังแผนภาพที่ 8 ได้สารประกอบ 6 เป็นสารบริสุทธิ์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 7 : แสดงการแยกสารจากส่วนย่อย COC9

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 8 : แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย fr.9/23/31

5.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์โดยวิธี Nitric oxide inhibitory assay [6]

1.) เตรียมเซลล์ macrophage J774.A1 ใน 96 well plate จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุมและปล่อยให้เซลล์ยึดเกาะกับเพลตเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะบรรยากาศ 5% CO_2 ในตู้บ่ม

2.) ทำการ pretreat เซลล์ใน well plate ที่ได้จากข้อ 1 ด้วยสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ หรือ DMSO สำหรับชุดควบคุม (control) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นด้วย lipopolysacharide 1 μg/mL (LPS) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.) เก็บ media จากแต่ละหลุมที่ทดสอบหลุมละ 50 μL จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent โดยเติม 1% sulfanilamide ต่อหลุม บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 0.1% *N*-1-napthylenediamine dihydrochloride (NED) 50 μL แล้วบ่มต่อในที่มืดอีก 10 นาที

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

5.) คำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งผลิตภัณฑ์ไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นและหาค่า IC_{50}

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

เมื่อ A_N คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร – ค่าการดูดกลืนแสงของชุด blank

A_C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม – ค่าการดูดกลืนแสงของชุด blank

5.3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) โดยวิธี MTT assay [6]

1.) ทำการเตรียมเซลล์ใน 96 well plate โดยใน 1 หลุมมีเซลล์ 10,000 เซลล์ และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ที่ความชื้นสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในตู้บ่ม

2.) จากนั้นทำการ pretreat เซลล์ด้วยสารที่แยกได้หรือ DMSO สำหรับชุดควบคุม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และทำการเติมสารละลาย MTT (10 μL, 5mg/mL ใน PBS) ลงในแต่ละหลุม จากนั้นทำการบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมง

3.) นำ media ออกจากแต่ละหลุมและเติม DMSO (100 μL/well) เพื่อละลายผลึกของฟอร์มาแซนที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

4.) คำนวณหาค่าเปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลล์

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

เมื่อ OD_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร

$OD_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
ผลการทดลอง และ วิจารณ์ผลการทดลอง

1 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากส่วนสกัดเฮกเซนของเปลือกเปล้าใหญ่ *C. oblongifolius*

1.1 การเตรียมส่วนสกัดเฮกเซนของเปลือกเปล้าใหญ่

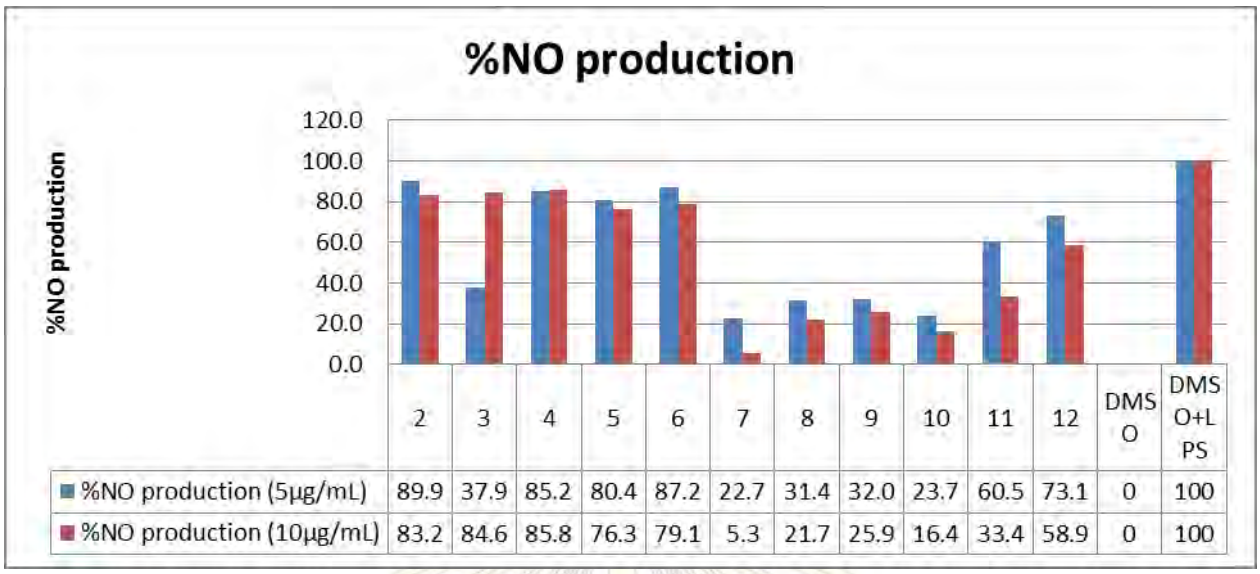
นำเปลือกเปล้าใหญ่ *C. oblongifolius* 2 กิโลกรัม มาแช่ในเฮกเซน ปริมาณ 3 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน และนำมากรอง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก จะได้ส่วนสกัดเฮกเซน จะได้ส่วนสกัดเฮกเซน 43.7 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีน้ำตาล

1.2 ผลการแยกส่วนสกัดเฮกเซนออกเป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำส่วนสกัดเฮกเซน 43.7 กรัม มาแยกเป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล No. 7734 เป็นวัฏภาคนิ่ง และตัวทำละลายผสมเอทิลแอซีเทตและเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ด้วยระบบตัวทำละลายเกรเดียนท์ จากการตรวจสอบองค์ประกอบด้วยเทคนิค TLC ทำให้สามารถรวมส่วนย่อยได้ทั้งหมด 12 ส่วน คือ COC1-COC12 (ดังแสดงในแผนภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจสอบองค์ประกอบโดยรวมอย่างคร่าวๆ ของแต่ละส่วนย่อยด้วยเทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy พบว่าส่วนย่อย COC6, COC7 และ COC9 มีสารที่น่าสนใจ

1.3 ผลการคัดกรองฤทธิ์ต้านการอักเสบ ของส่วนย่อยที่แยกได้

เนื่องด้วยในงานวิจัยนี้สนใจสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์การต้านการอักเสบในเซลล์ macrophage ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) จึงทำการสกัดแยกสารโดยอาศัยผลต้านการอักเสบ ดังนั้นจึงนำส่วนย่อยของส่วนสกัดเอทิลแอซีเทตที่ได้มาคัดกรองฤทธิ์ต้านการอักเสบหรือการยังยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์ macrophage ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ macrophage J774.A1 ในการทดลองนำส่วนย่อย COC2-COC12 ความเข้มข้น 5 และ 10 μg/mL มาทำการทดลองกับเซลล์ พบว่า ส่วนย่อย COC6, COC7, COC9 แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการผลิต ไนตริกออกไซด์ จากเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำในระดับที่ต่ำกว่า 50% และพิจารณาร่วมกับผล ^{1}H NMR spectrum ซึ่งมีโครงสร้างสารที่สนใจจะศึกษา จึงเลือกทำส่วนย่อยดังกล่าว



รูปที่ 6 เปอร์เซนต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ macrophage J774.A1 **ที่ถูกกระตุ้นด้วย** LPS **เมื่อทดสอบกับส่วนย่อย** COC2 – COC12

2 ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

2.1 ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC8

เนื่องจากส่วนย่อย COC8 เกิดของแข็งสีขาว จึงทำการกรองแยกของแข็ง พบว่าได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบ **1** หนัก (41.0 มิลลิกรัม)

2.2 ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC7

นำส่วนย่อย COC7 (840.5 มิลลิกรัม) ซึ่งพิจารณาจากผลจากการคัดกรองฤทธิ์ต้านการอักเสบและ ^{1}H NMR spectrum มาทำการแยกองค์ประกอบต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH20 เป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สามารถแยกได้เป็น 6 ส่วนย่อย คือ C7-1 ถึง C7-6 จากนั้นนำส่วนย่อย C7-5 (196.6 มิลลิกรัม) ซึ่งพิจารณาจาก^{1}H NMR spectrum มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 5% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 7 ส่วน และเลือกส่วนย่อย T6-18 (25.0 มิลลิกรัม) ซึ่งพิจารณาจาก ^{1}H NMR spectrum มาแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกัน โดยใช้ 20% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบ **2** (6.9 มิลลิกรัม) และเลือกส่วนย่อย T19-23 (25.0 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยเทคนิคเดียวกัน ใช้ 30% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบ **3** (3.3 มิลลิกรัม)

2.3 ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC6

นำส่วนย่อย COC6 (9.8 กรัม) มาแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และตัวทำละลาย 5% อะซิโตนในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกองค์ประกอบได้ 10 ส่วนย่อย จากนั้นนำส่วนย่อย fr.48-63 (777.9 มิลลิกรัม) ซึ่งพิจารณาจากผลจากการคัดกรองฤทธิ์ต้านการอักเสบและ ^{1}H NMR spectrum มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 1% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบ **4** (20.0 มิลลิกรัม) จากนั้นนำส่วนย่อย fr.48-63/26-37 (108.3 มิลลิกรัม) มาแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 10% อะซิโตนในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบ **5** หนัก (12.8 มิลลิกรัม)

2.4 ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย COC9

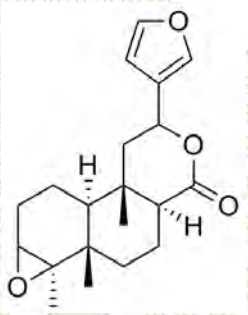
นำส่วนย่อย COC9 (248.4 มิลลิกรัม) งพิจารณาจากผลจากการคัดกรองฤทธิ์ต้านการอักเสบและ ^{1}H NMR spectrum มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดย ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และ 5% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 6 ส่วนย่อย คือ fr.9/4 ถึง fr.2/27 จากนั้นนำส่วนย่อย fr.9/23 (298.1 มิลลิกรัม) ซึ่งพิจารณาจาก ^{1}H NMR spectrum มาแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกัน ใช้ 5%เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกได้เป็น 6 ส่วนย่อย จากนั่นนำส่วนย่อย fr.9/23/31 (21.6 มิลลิกรัม) ซึ่งพิจารณาจาก ^{1}H NMR spectrum มาแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกัน ใช้ 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบ **6** (3.4 มิลลิกรัม)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 ผลการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปีได้ผลการทดลองดังนี้

<u>สารประกอบ 1</u> หนัก 41.0 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{26}O_4$ จากข้อมูล ^{1}H NMR spectrum และเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลกับงานวิจัยก่อนหน้า[6] พบว่าเป็นสารที่มีชื่อว่า 3,4,15,16-Diepoxy-cleroda-13(16),14-diene-12,17-olide

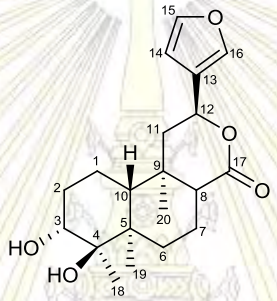


รูปที่ 7 **โครงสร้างของ** 3,4,15,16-Diepoxy-cleroda-13(16),14-diene-12,17-olide

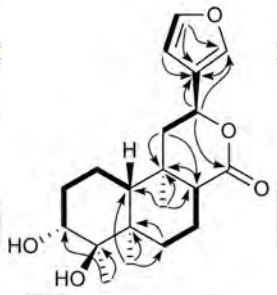
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>สารประกอบ 2</u> หนัก 6.9 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{28}O_5$ มี double bond equivalent เท่ากับ 7 จากข้อมูล ^{1}H NMR spectrum พบว่า มีสัญญาณของวงฟิวแรน และหมู่เมทิล (CH_3) 3 หมู่ และ ^{13}C NMR spectrum พบว่า มีพันธะคู่ 2 พันธะ (δ_C 143.7, 139.4, 126.1, 108.6) มีสัญญาณของหมู่เอสเทอร์ (COO) 1 หมู่ (δ_C 172.4)

อีกทั้งข้อมูลจาก ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC และ HMBC ยังแสดงให้เห็นว่า สารประกอบ **3** มีควอเทอร์นารีคาร์บอน 3 คาร์บอน หมู่เมทิลีน (CH_2) 5 หมู่, หมู่เมไธน์ (CH) 7 หมู่ และหมู่ไฮดรอกซี (OH) 2 หมู่ เมื่อนำข้อมูลข้างต้นทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับค่า chemical shift ที่มีการรายงานแล้ว พบว่า สารประกอบ **3** คือ furocrotinsulolide A ซึ่งเป็นสารที่เคยแยกได้จากต้น *Croton insularis*[8] เมื่อปี 2005



รูปที่ 8 โครงสร้างของ furocrotinsulolide A

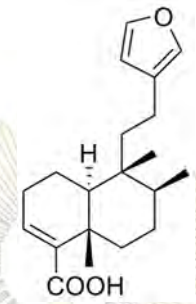


รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H-^{1}H COSY **และ** HMBC **ของ** furocrotinsulolide A

ตารางที่ 1 ข้อมูล ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) และ HMBC correlation ($CDCl_3$) ของสารประกอบ **2**

ตำแหน่ง	สารประกอบ 3		
	^{1}H (mult, *J* in Hz)	^{13}C	HMBC correlations
1	1.66 (m, 1H), 1.42 (m, 1H)	16.5	30.5
2	2.05 (m, 1H), 1.75 (m, 1H)	30.5	76.4, 16.5
3	3.59 (brs, 1H)	76.4	
4		76.1	
5		40.8	
6	1.63 (m, 2H)	31.6	40.8,17.7
7	2.08 (m, 1H), 1.67 (m, 1H)	17.7	51.1, 31.6
8	2.34 (m, 1H)	51.1	36.8
9		36.8	
10	1.78 (m, 1H)	47.3	40.8, 36.8, 16.5
11	2.33 (m, 1H), 1.68 (m, 1H)	44.5	72.0, 51.1, 36.8
12	5.49 (dd, 1H, *J* = 11.6, 5.6)	72.0	172.7, 139.4, 126.1, 108.9
13		126.1	
14	6.42 (brs, 1H)	108.6	143.7, 126.1,139.4
15	7.41 (brs, 1H)	143.7	139.4, 126.1
16	7.44 (brs, 1H)	139.4	143.7, 108.6, 126.1
17		172.7	
18	1.29 (s, 3H)	21.6	76.4, 40.8
19	1.20 (3H, s)	17.2	76.1, 47.3, 40.8, 31.6
20	1.09 (s, 3H)	14.7	51.1, 47.3, 44.5, 36.8

<u>สารประกอบ 3</u> หนัก 3.3 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{28}O_3$ จากข้อมูล ^{1}H NMR spectrum และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า [6] พบว่า เป็นสารที่มีชื่อว่า (+)-Hardwickiic acid

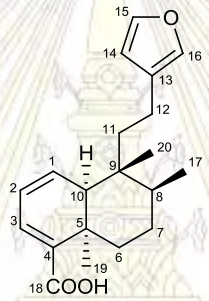


รูปที่ 10 โครงสร้างของ (+)-Hardwickiic acid

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>สารประกอบ **4**</u> หนัก 20.0 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{26}O_3$ มี double bond equivalent เท่ากับ 8 จากข้อมูล ^{1}H NMR spectrum พบสัญญาณของวงฟิวแรน หมู่เมทิล (CH_3) 3 หมู่ และ ^{13}C NMR spectrum พบว่ามีพันธะคู่ 4 พันธะ (δ_C 142.7, 139.7, 138.5, 136.0, 133.7, 125.4, 124.6, 110.9) หมู่คาร์บอกซิล (COOH) 1 หมู่ (δ_C 172.7)

อีกทั้งข้อมูลจาก ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC และ HMBC ยังแสดงให้เห็นว่า สารประกอบ **4** มีควอเทอร์นารีคาร์บอน 3 คาร์บอน หมู่เมไธน์ (CH) 8 หมู่, หมู่เมทิลีน (CH_2) 4 หมู่, และเมื่อนำข้อมูลข้างต้นทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับค่า chemical shift ที่มีการรายงานแล้ว พบว่าสารประกอบ **4** คือ 5-epi-nidoresedic acid ซึ่งเป็นสารที่เคยแยกได้จากต้น *Scapania nemorea* [9] เมื่อปี 1999



รูปที่ 11 โครงสร้างของ 5-epi-nidoresedic acid

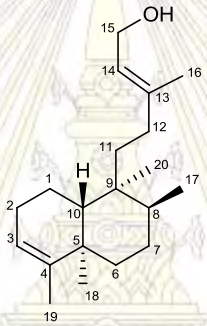
รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H-^{1}H COSY **และ** HMBC **ของ** 5-epi-nidoresedic acid

ตารางที่ 2 ข้อมูล ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) และ HMBC correlation ($CDCl_3$) ของสารประกอบ **4**

ตำแหน่ง	สารประกอบ 4		
	^{1}H (mult, *J* in Hz)	^{13}C	HMBC correlations
1	6.19 (m, 1H)	124.6	133.7, 48.4
2	6.95 (d, 1H)	133.7	172.7, 139.7, 136.0, 38.3
3	6.27 (m, 1H)	136.0	139.7, 133.7
4		139.7	
5		38.8	
6	2.47 (m, 1H), 1.45 (m, 1H)	34.6	48.4
7	1.49 (brd, 2H)	27.3	35.7, 34.6
8	1.16 (m, 1H)	35.7	38.5, 27.3, 15.7
9		38.5	
10	2.38 (brs, 1H)	48.4	124.6, 38.8, 38.5
11	1.73 (m, 1H), 1.62 (m, 1H)	38.3	125.4, 18.2
12	2.31 (m, 1H), 2.16 (m, 1H)	18.2	138.5, 125.4, 110.9
13		125.4	
14	6.24 (s, 1H)	110.9	142.7
15	7.34 (s, 1H)	142.7	138.5, 125.4
16	7.19 (s, 1H)	138.5	142.7, 110.9
17	0.85 (d, 3H, *J* = 6.4)	15.7	38.5, 35.7, 27.3
18		172.7	
19	1.06 (s, 3H)	15.4	139.7, 48.4, 38.8, 34.6
20	0.89 (s, 3H)	19.4	48.8, 38.3, 35.7, 18.2

<u>สารประกอบ 5</u> หนัก 12.8 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{34}O$ มี double bond equivalent เท่ากับ 4 จากข้อมูล ^{1}H NMR spectrum พบสัญญาณของหมู่เมทิล (CH_3) 5 หมู่ สัญญาณช่วง δ_H 1-2.5 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ และ ^{13}C NMR spectrum พบว่ามีพันธะคู่ 2 พันธะ (δ_C 145.5, 140.9, 122.9, 120.4)

อีกทั้งข้อมูลจาก ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC และ HMBC ยังแสดงให้เห็นว่า สารประกอบ 2 มีควอเทอร์นารีคาร์บอน 2 คาร์บอน หมู่เมไธน์ (CH) 2 หมู่, หมู่เมทิลีน (CH_2) 7 หมู่ และเมื่อนำข้อมูลข้างต้นทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับค่า chemical shift ที่มีการรายงานแล้ว พบว่าสารประกอบ 5 คือ 8S-Kolavenol ซึ่งเป็นสารที่เคยแยกได้จากต้น *Entada abyssinica* [10] เมื่อปี 1998



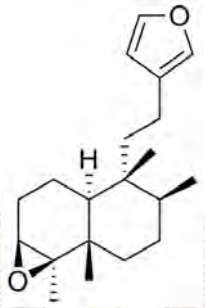
รูปที่ 13 โครงสร้างของ 8S-Kolavenol

รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H-^{1}H COSY **และ** HMBC **ของ** 8S-Kolavenol

ตารางที่ 3 ข้อมูล ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) และ HMBC correlation ($CDCl_3$) ของสารประกอบ **5**

ตำแหน่ง	สารประกอบ 5		
	^{1}H (mult *J* in Hz)	^{13}C	HMBC correlations
1	1.59 (m, 1H), 1.45 (m, 1H)	18.3	26.9
2	2.03 (m, 2H)	26.9	120.4
3	5.19 (s, 1H)	120.4	145.5, 17.9
4		145.5	
5		38.2	
6	1.72 (m ,1H) 1.47, m, 1H	36.8	27.5
7	1.41 (m, 2H)	27.5	36.8, 36.3
8	1.46 (m, 1H)	36.3	38.6, 18.4
9		38.6	
10	1.35 (m, 1H)	46.5	38.2, 19.9
11	1.36 (m, 1H), 1.20 (m ,1H)	36.9	32.8
12	1.84 (m, 2H)	32.8	36.9, 16.5
13		140.9	
14	5.39 (t, 1H *J* = 4.4)	122.9	59.5, 32.8, 16.5
15	4.13 (d, 2H, *J* = 6.8)	59.5	140.9, 122.9
16	1.67 (s, 3H)	16.5	140.9, 122.9, 32.8
17	0.80 (d, 3H, J = 6.0)	15.9	38.6, 36.3, 27.5
18	0.99 (s, 3H)	19.9	144.5, 46.5, 38.2, 36.8
19	1.58 (s, 3H)	17.9	144.5, 120.4, 38.2
20	0.71 (s ,3H)	18.4	46.5, 36.9, 32.8

<u>สารประกอบ 6</u> หนัก 3.4 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{30}O_2$ จากข้อมูล ^{1}H NMR spectrum และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า[6] พบว่า เป็นสารที่มีชื่อว่า 3α,4α:15,16-Diepoxy-13(16),14-clerodadiene



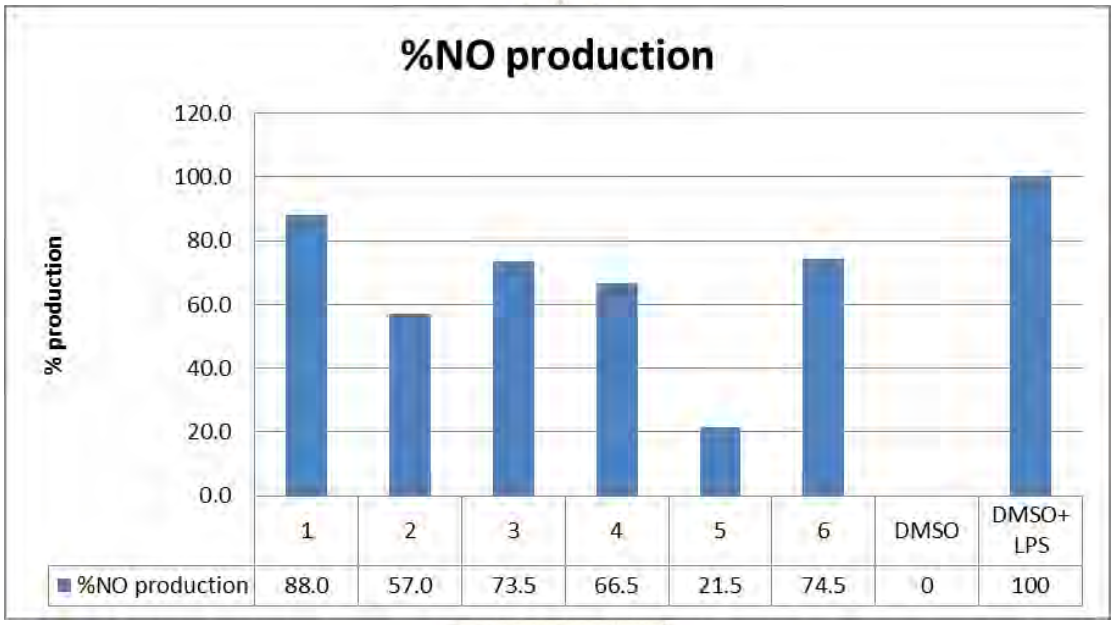
รูปที่ 15 **โครงสร้างของ** 3α,4α:15,16-Diepoxy-13(16),14-clerodadiene

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารประกอบ 1 - 6 ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี nitric oxide inhibitory assay โดยเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือเซลล์ murine macrophage J774.A1 ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 10 μg/mL ซึ่งจะทำให้เกิดการผลิตไนตริกออกไซด์ขึ้น ผลที่ได้ดังแสดงใน รูปที่ 16

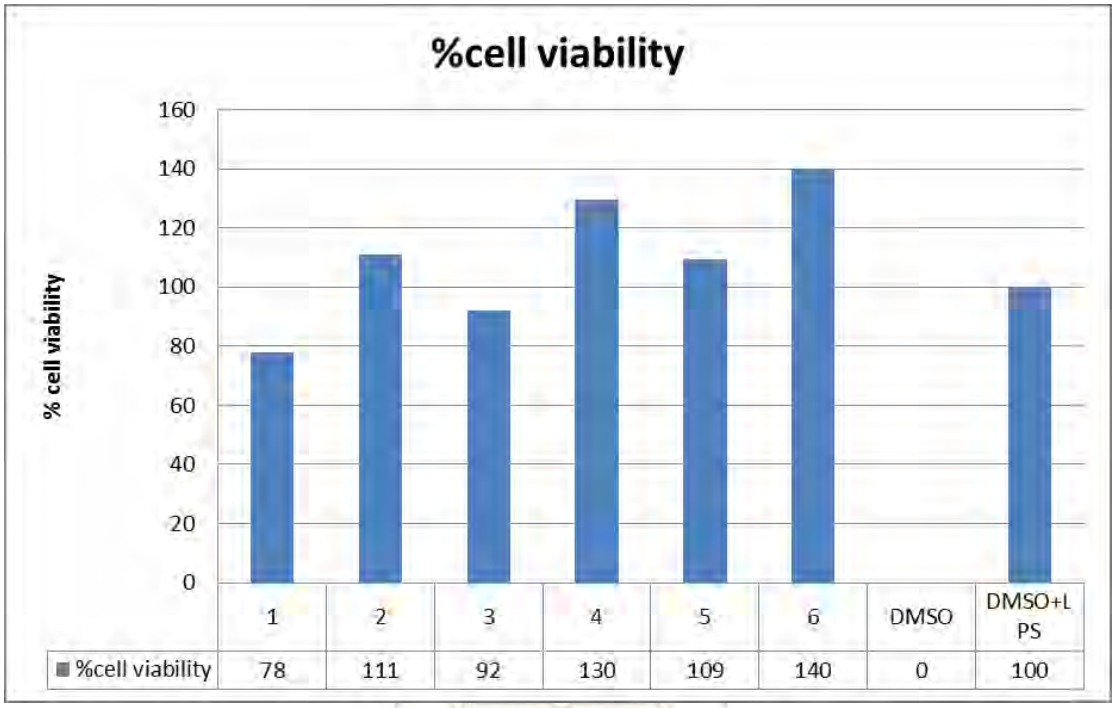


รูปที่ 16 เปอร์เซนต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ macrophage J774.A1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อทดสอบกับสารประกอบ 1 – 6 ที่ความเข้มข้น 10 μg/mL

จากรูปที่ 16 พบว่าสารประกอบ 5 แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ murine macrophage J774.A1 ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.00 μg/mL (17.21μM) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบ 5 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี โดยเทียบกับชุดควบคุมของยา Indromethacin ซึ่งเป็นยาที่ใช้ต้านการอักเสบ โดย Indromethacin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.42 ± 3.51μM [11] เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารประกอบ 5 พบว่า สารประกอบ 5 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบระดับเซลล์ที่ดีกว่า

4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

นำสารประกอบ 1 - 6 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ macrophage J774.A1 ด้วยวิธี MTT assay โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 10 μg/mL ผลที่ได้ดังแสดงใน รูปที่ 17



รูปที่ 17 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์ macrophage J774.A1 **ที่ถูกกระตุ้นด้วย** LPS **เมื่อทดสอบกับสารประกอบ** 1 – 6 **ที่ความเข้มข้น** 10 μg/mL

จากรูปที่ 17 พบว่า สารประกอบ 5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ เนื่องจากไม่พบการตายของเซลล์ macrophage J774.A1 ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารประกอบ 5 สามารถลดการอักเสบได้จริง ไม่ได้มาจากการที่สารเป็นพิษต่อเซลล์

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้สนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเปลือกเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* โดยมีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยดูจากความสามารถของสารในการยับยังการผลิตไนตริก ออกไซด์ (NO) ในเซลล์ macrophage ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay จากผลการทดลองพบว่า สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 6 ชนิด คือ 3,4,15,16-Diepoxy-cleroda-13(16),14-diene-12,17-olide, furocrotinsulolide A, (+)-Hardwickiic acid, 5-epi-nidoresedic acid, 8S-Kolavenol, 3α,4α:15,16-Diepoxy-13(16),14-clerodadiene พบว่าสารประกอบ **5** มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.00 μg/mL และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ เมื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค 1D และ 2D NMR พบว่าสารประกอบ **5** คือ 8S-Kolavenol

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

[1] ผศ.ดร.เภสัชกรหญิง สุดารัตน์ หอมหวล (2010). *เปล้าใหญ่*. วันที่สืบค้นข้อมูล 15 กันยายน 2555 จากเว็ปไซต์ http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=74

[2] กรีนนอรัลด์ ดอทคอม (2013). *เปล้าใหญ่ สรรพคุณและประโยชน์ของเปล้าใหญ่ 40 ข้อ! (เปล้าหลวง)*. วันที่สืบค้นข้อมูล 24 ธันวาคม 2556 จากเว็ปไซต์

[3] James R. Hanson (2013). *Terpenoids and Steroids Volume 12*. วันที่สืบค้นข้อมูล 9 มีนาคม 2556 จากเว็ปไซต์ http://books.google.co.th/books?id=PHkJKxprCJQC&lpg=PA187&ots=e9Gn-3cAdu&dq=optical%20rotation%20and%20structure%20in%20the%20labdane%20series%20of%20diterpenoids&pg=PA33#v=onepage&q=optical%20rotation%20and%20structure%20in%20the%20labdane%20series%20of%20diterpenoids&f=false

[4] Roengsumran S.; Petsom A.; Sommit D.; Vilaivan T. *Phytochemistry*. 1999, 50, 449-453.

[5] Roengsumran S.; Petsom A.; Kuptiyanuwat N.; Vilaivan T.; Ngamrojnavanich N.; Chaichantipyuth C.; Phuthong S. *Phytochemistry*. 2001, 56, 103-107.

[6] Pudhom K.; Sommit D. *Phytochemistry Letters*. 2011, 4, 147-150.

[7] Salman K.; Omer S.; Jin H.; Woo E.; Kang S.; Baek S.; Kim J.; Kim Y. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 67-71.

[8] Graikou K.; Aligiannis N.; Chinou I.; Skaltsounis A.; Tillequin F.; Litaudon M. *Helvetica Chemica Acta*. 2005, 88, 2654-2660.

[9] Geis W.; Buschauer B.; Becker H. *Phytochemistry*. 1999, 51, 643-649.

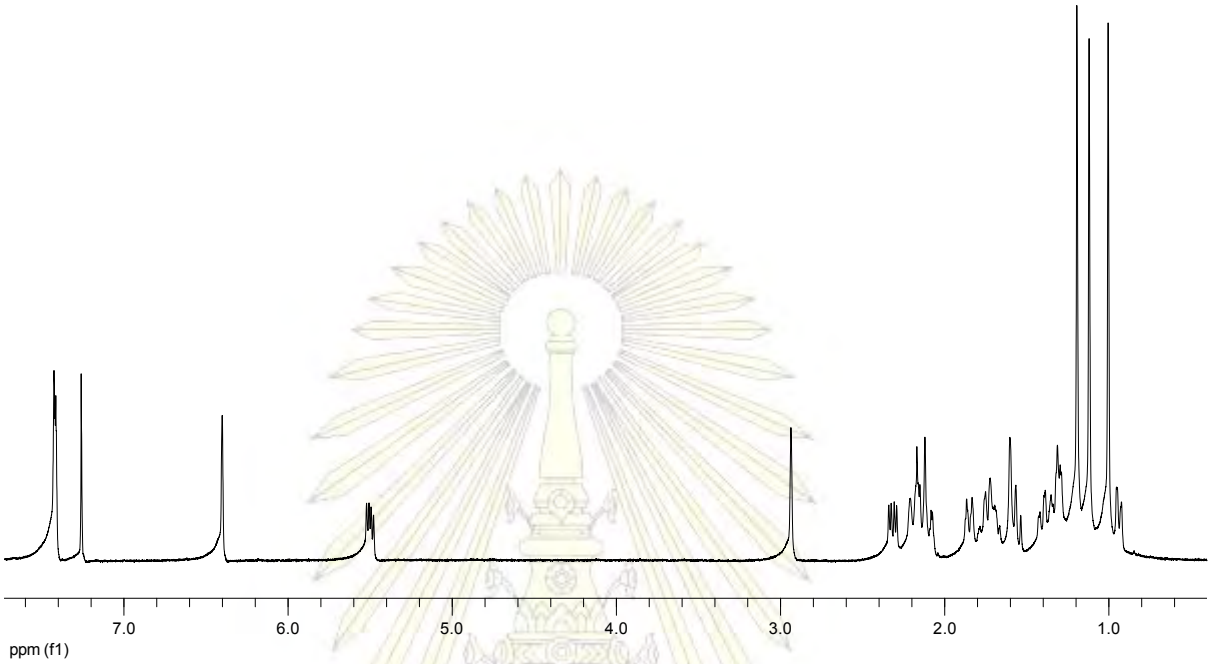
[10] Freiburghaus F.; Steck A.; Pfander H.; Brun R. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998, 61, 179-183.

[11] Choodej S.; Sommit D.; Pudhom K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, 23, 3896-3900.

ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

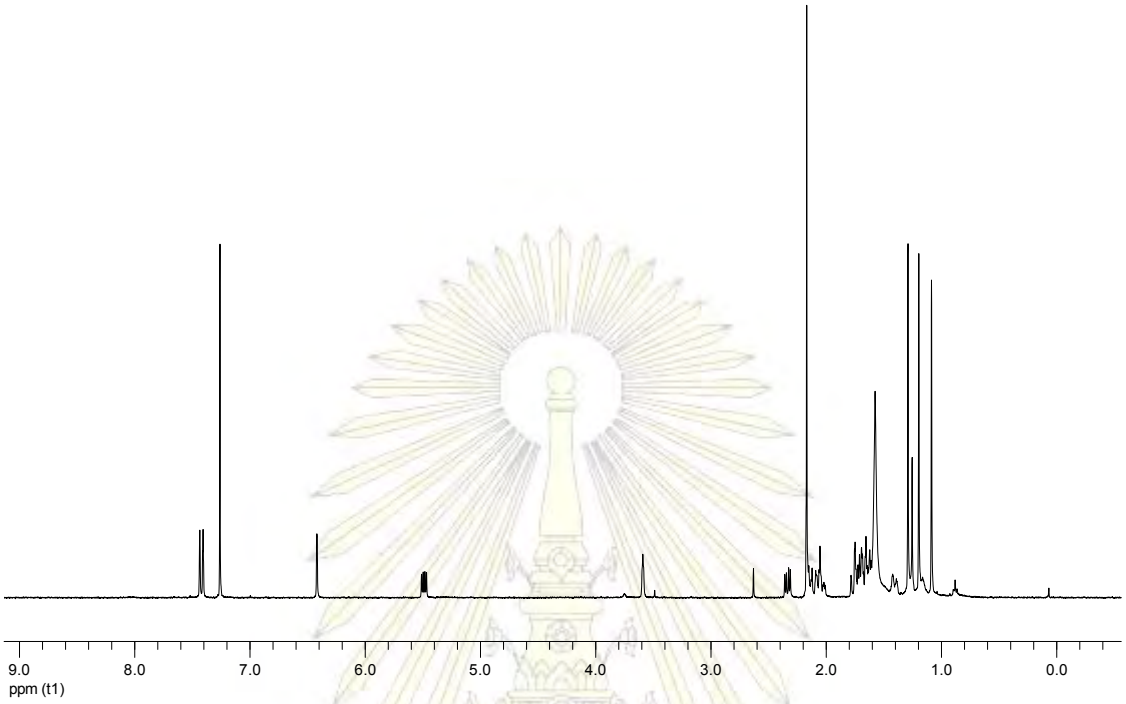
สารประกอบ 1



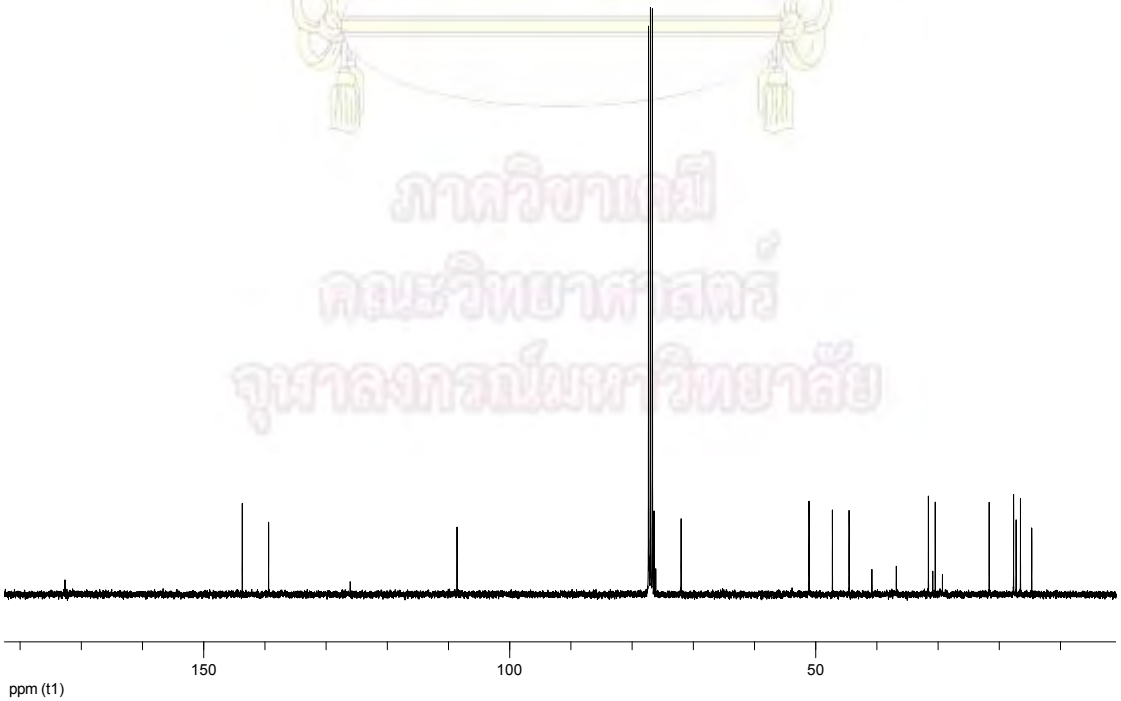
รูปที่ 1 ^{1}H NMR ของสารประกอบ 1

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

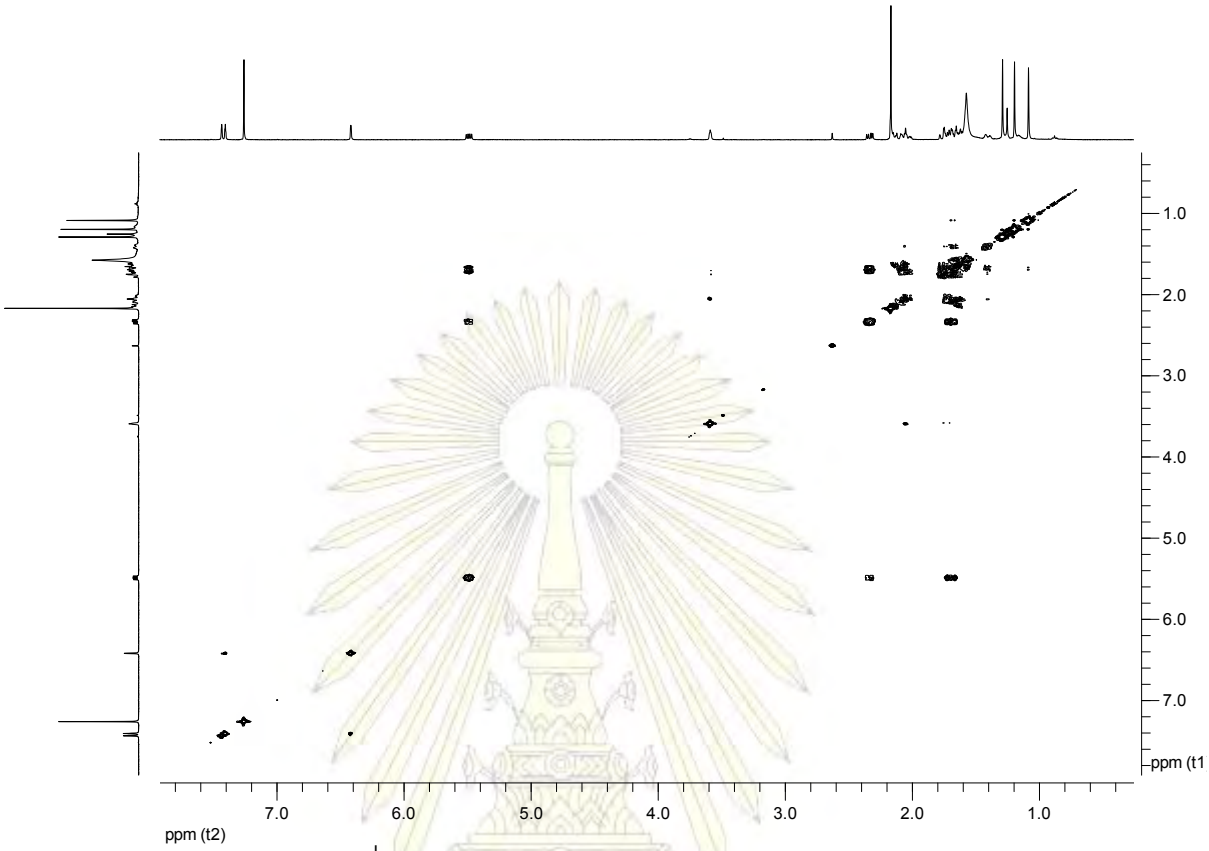
สารประกอบ 2



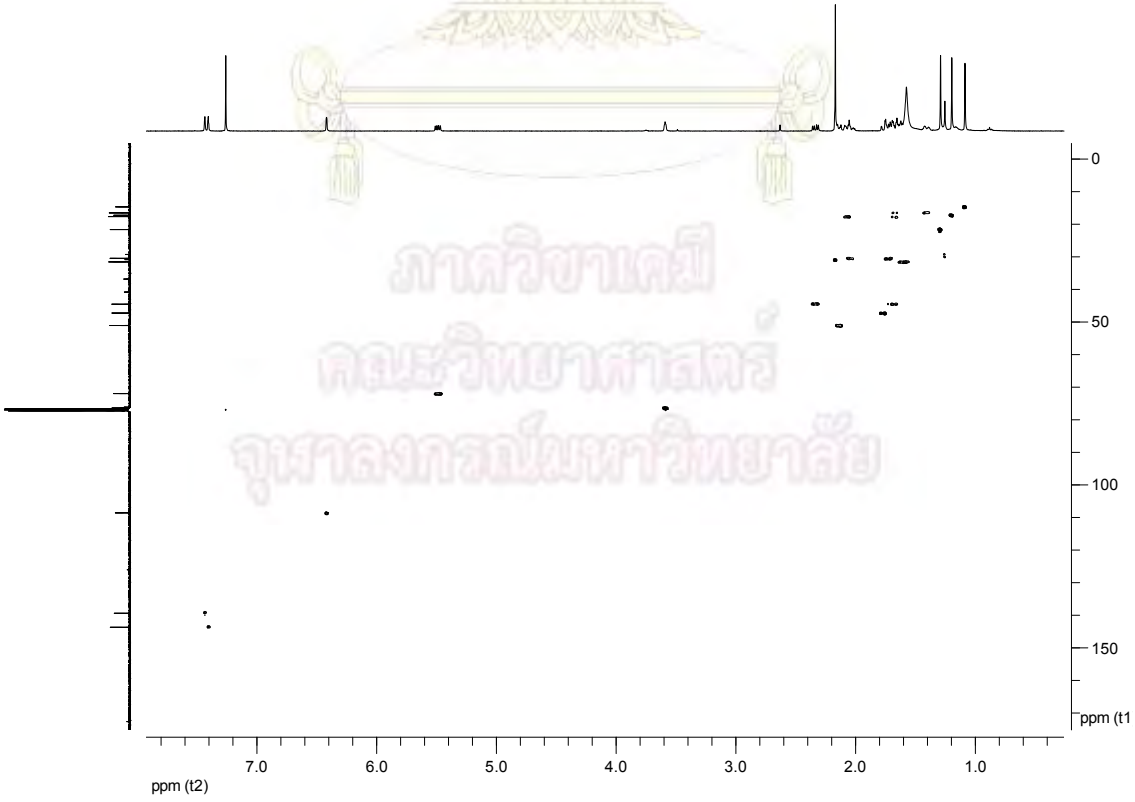
รูปที่ 2 ^{1}H NMR ของสารประกอบ 2



รูปที่ 3 ^{13}C NMR ของสารประกอบ 2

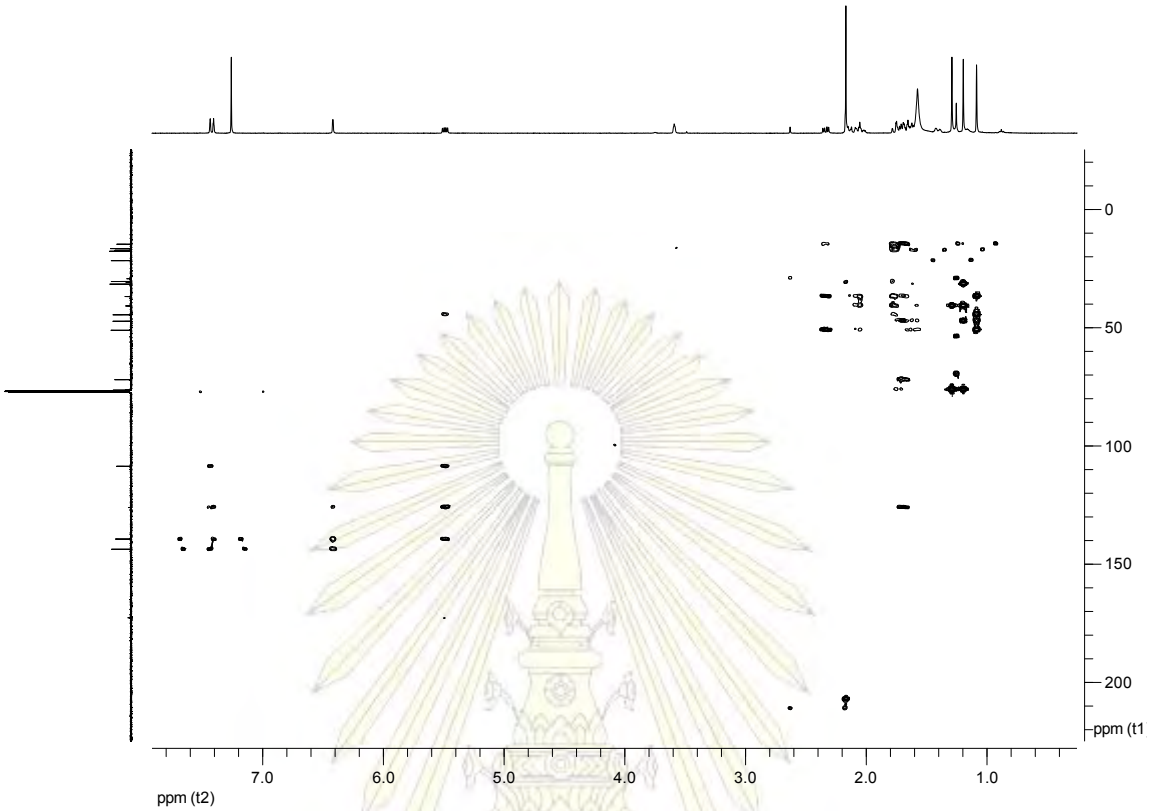


รูปที่ 4 ^{1}H-^{1}H COSY ของสารประกอบ 2



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

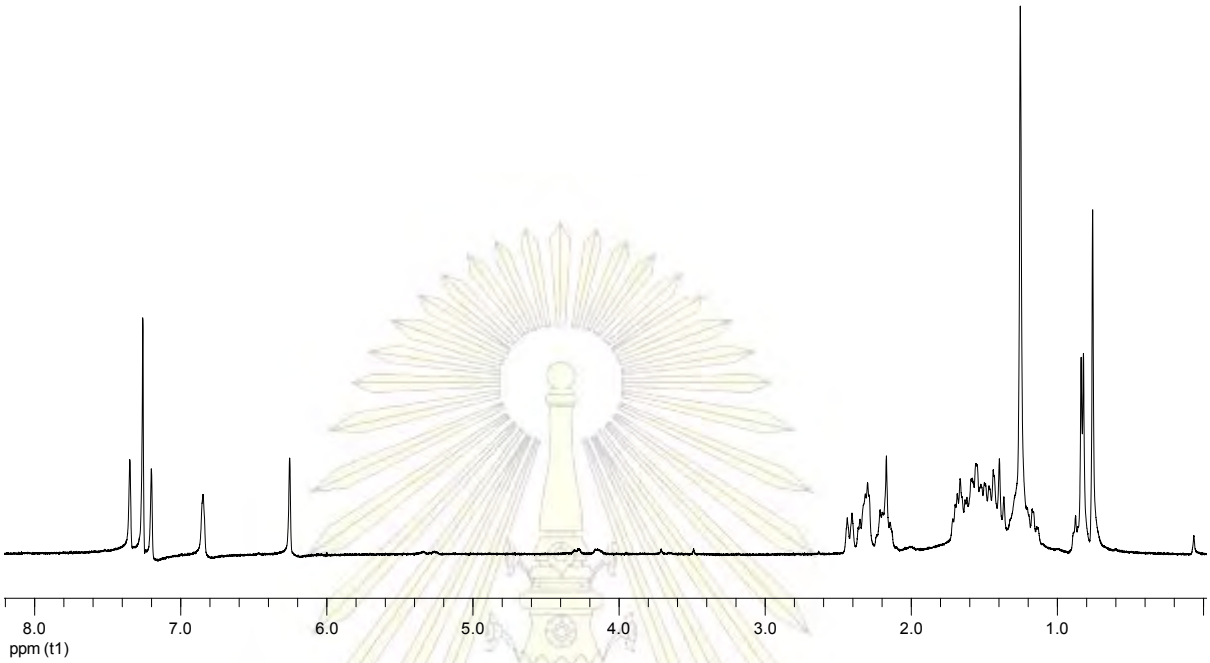
รูปที่ 5 HSQC ของสารประกอบ 2



รูปที่ 6 HMBC ของสารประกอบ 2

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

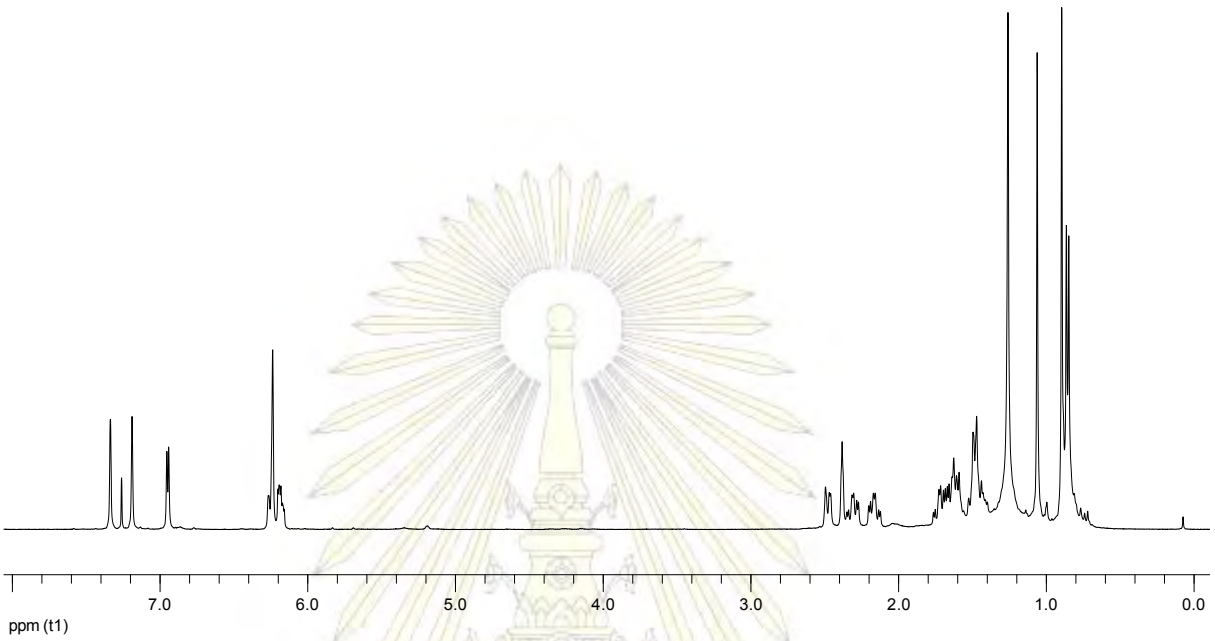
สารประกอบ 3



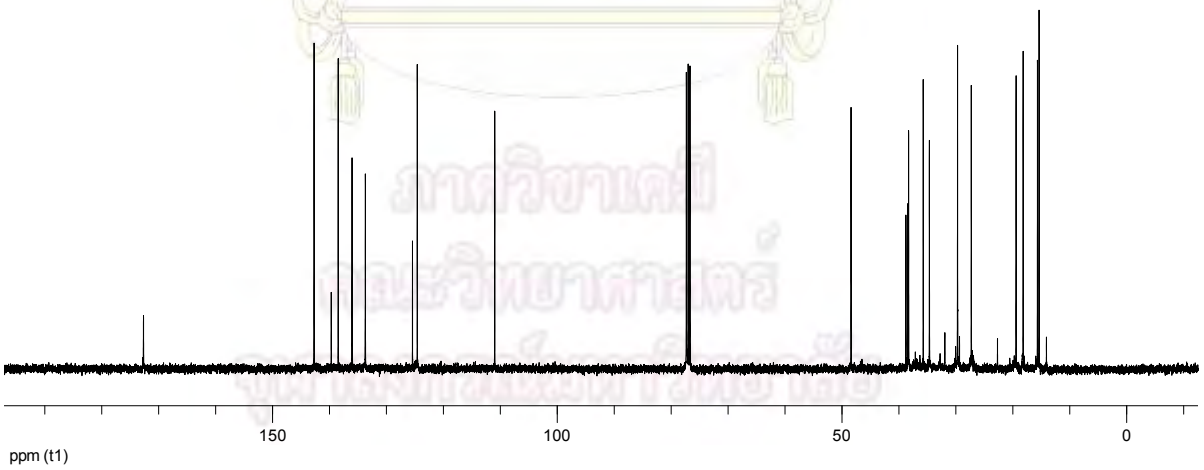
รูปที่ 7 ^{1}H NMR ของสารประกอบ 3

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

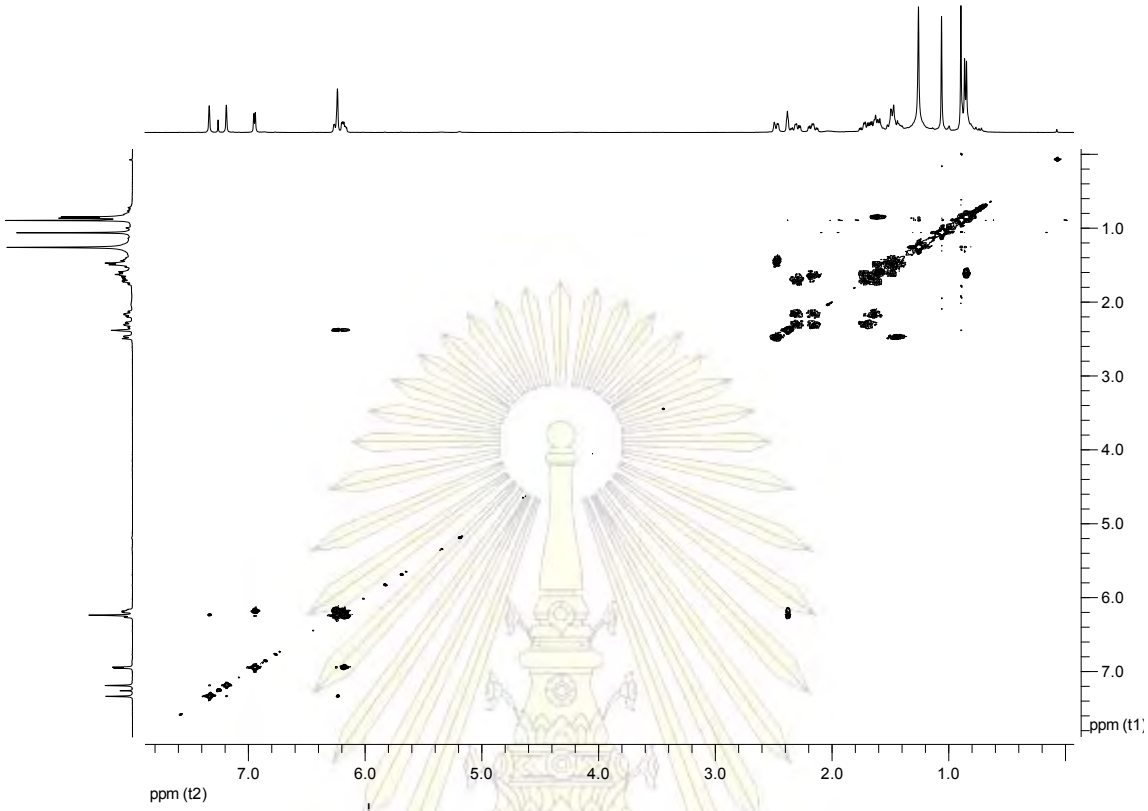
สารประกอบ 4



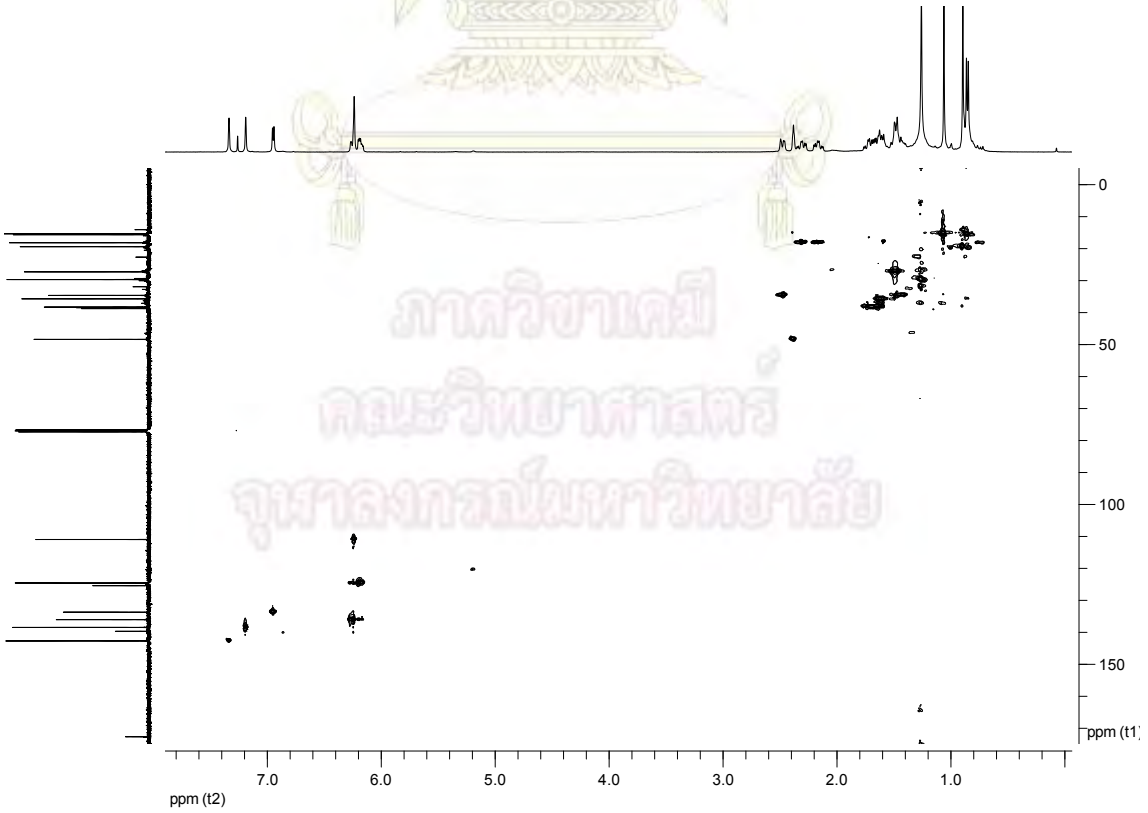
รูปที่ 8 ^{1}H NMR ของสารประกอบ 4



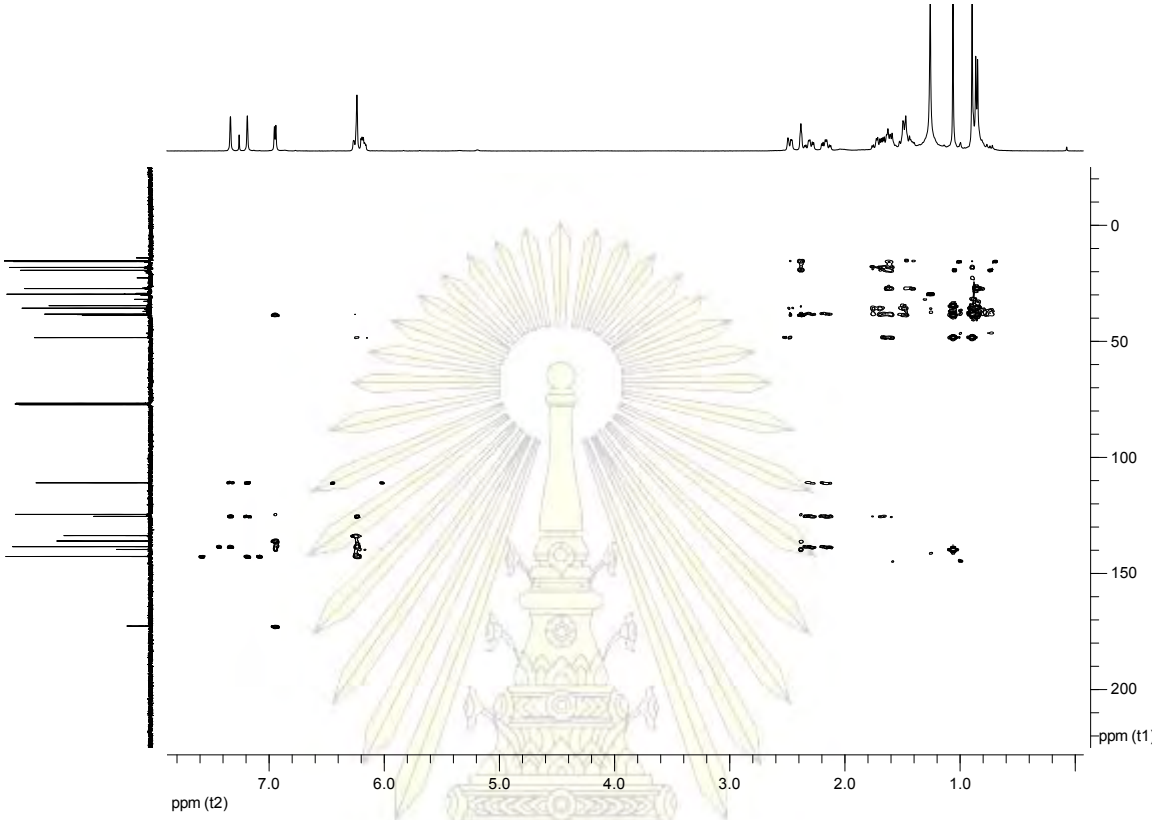
รูปที่ 9 ^{13}C NMR ของสารประกอบ 4



รูปที่ 10 ^{1}H-^{1}H COSY ของสารประกอบ 4



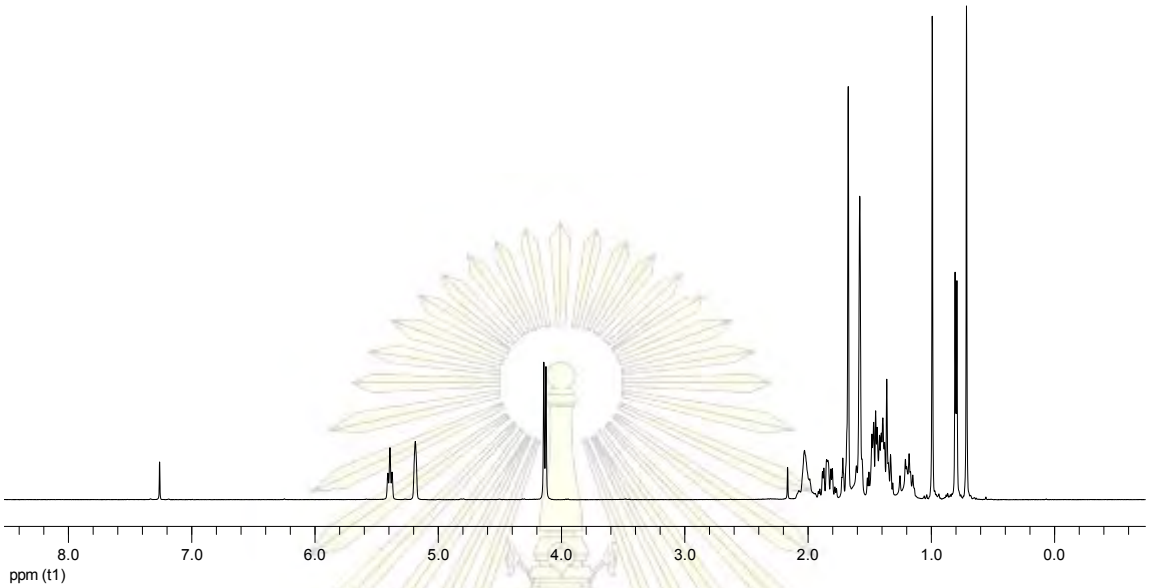
รูปที่ 11 HSQC ของสารประกอบ 4



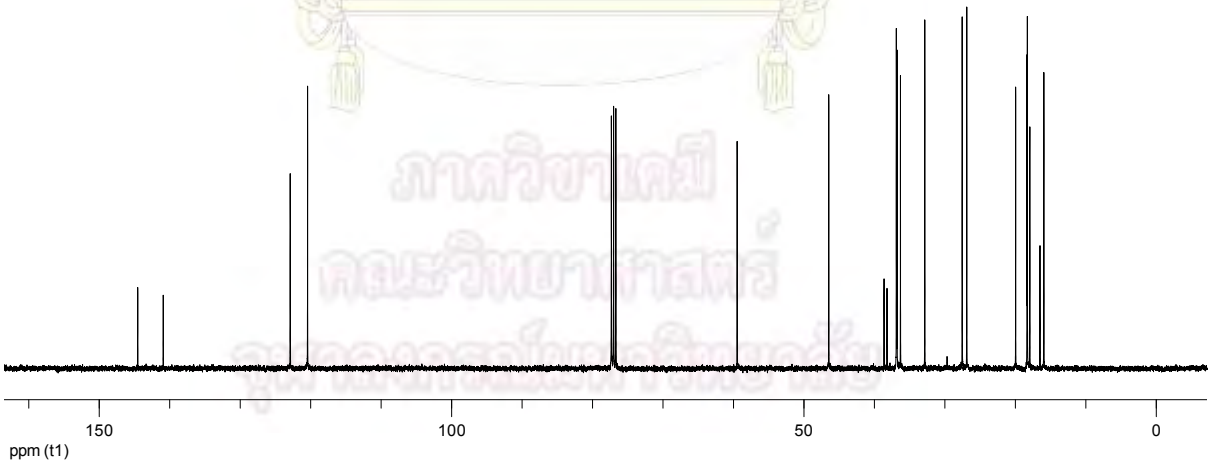
รูปที่ 12 HMBC ของสารประกอบ 4

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

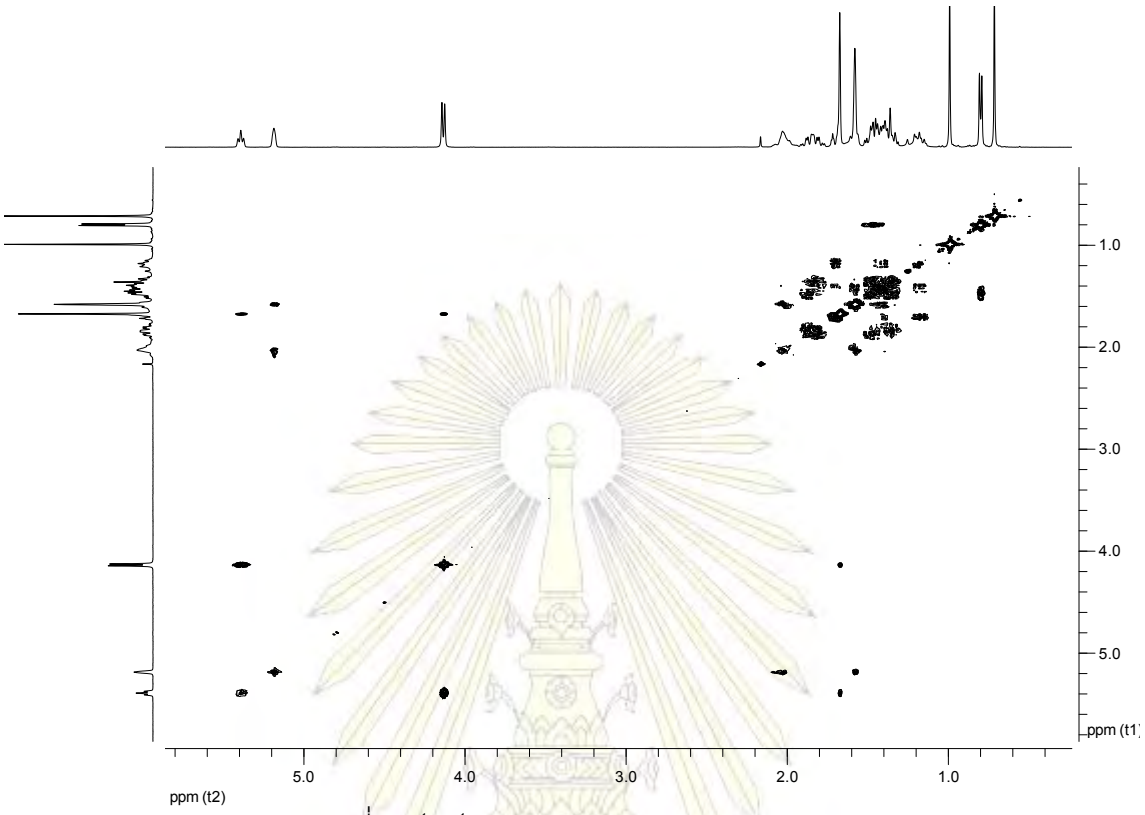
สารประกอบ 5



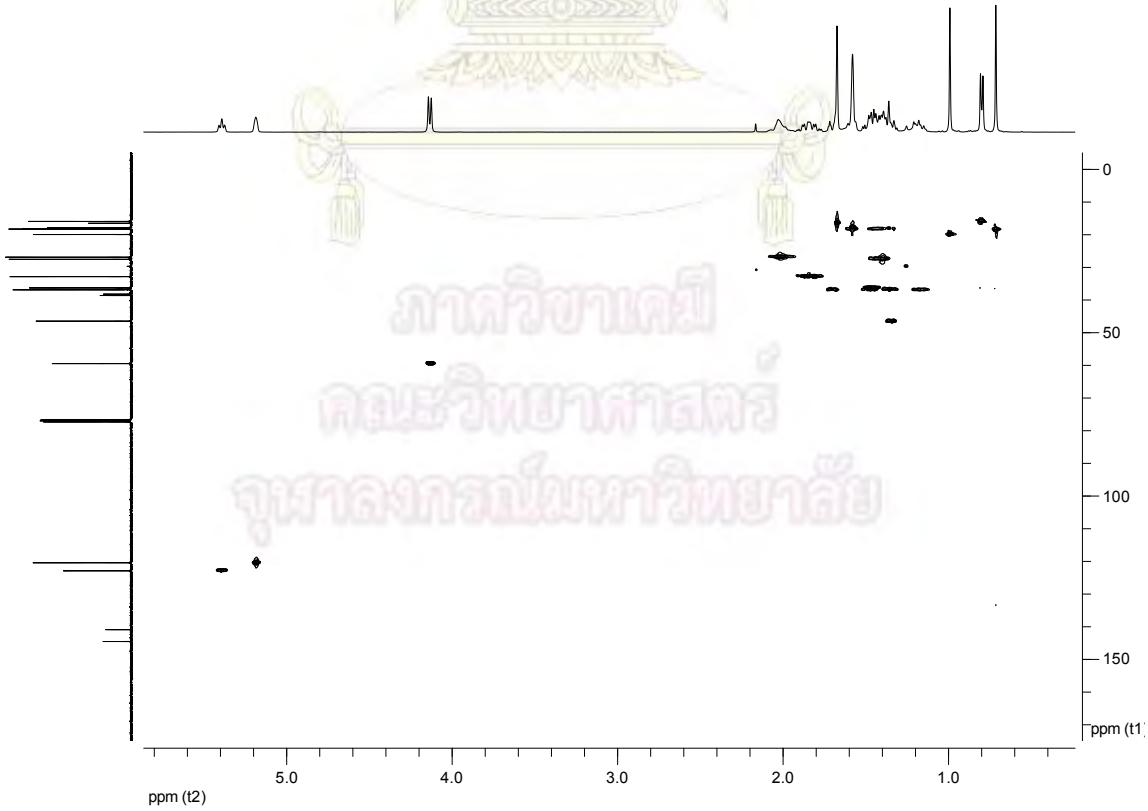
รูปที่ 13 ^{1}H NMR ของสารประกอบ 5



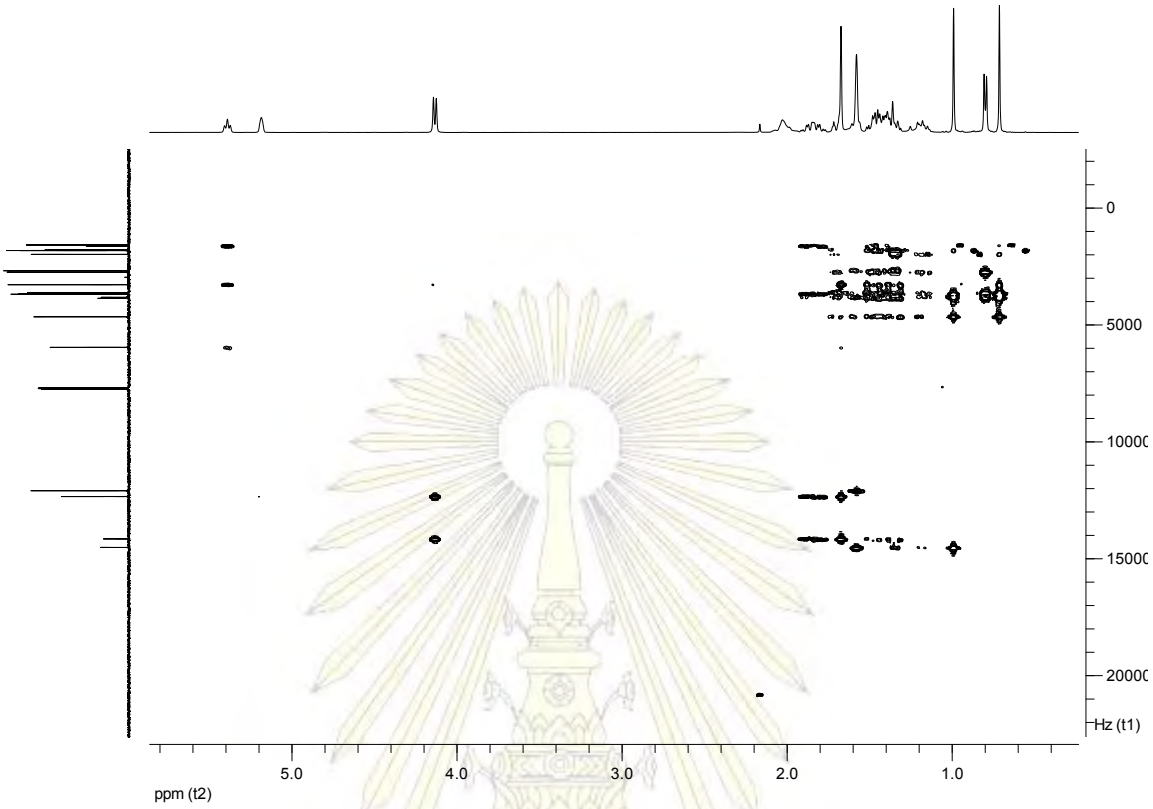
รูปที่ 14 ^{13}C NMR ของสารประกอบ 5



รูปที่ 15 ^{1}H-^{1}H COSY ของสารประกอบ 5



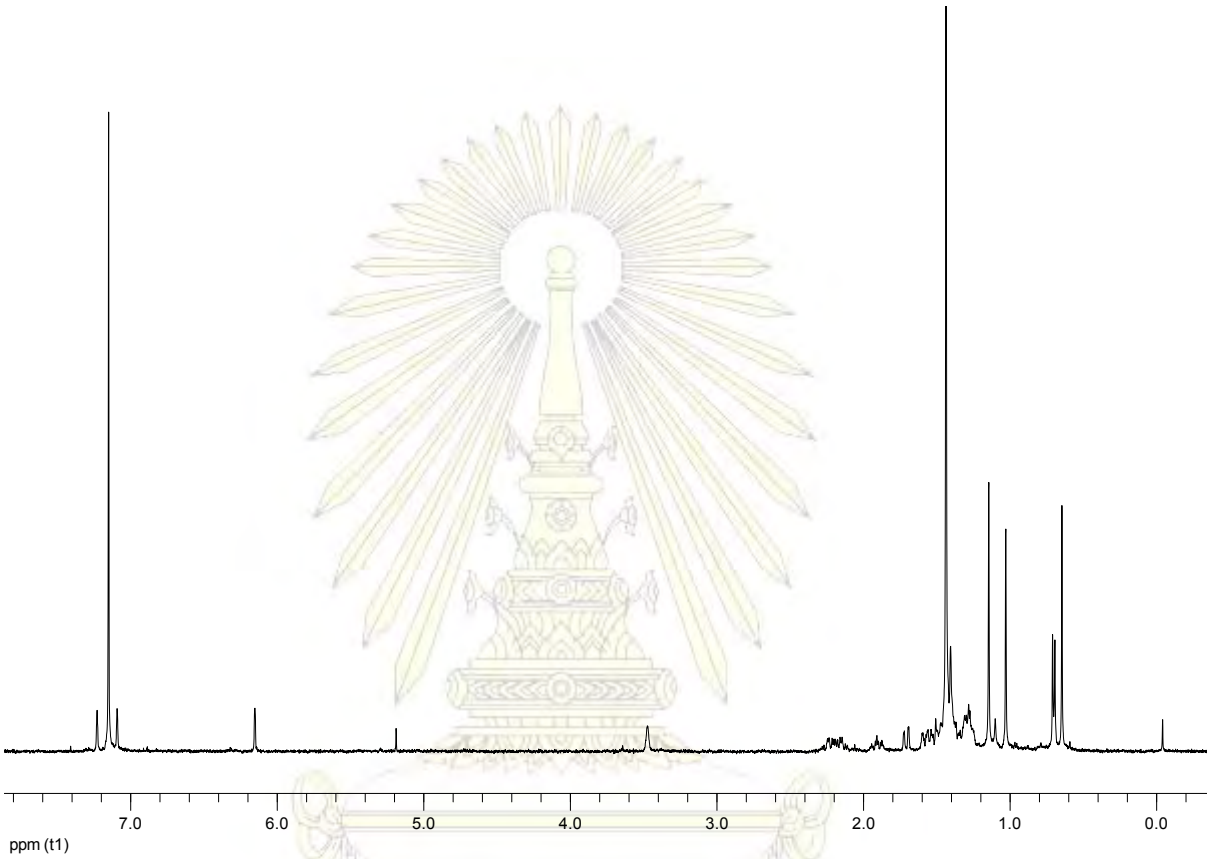
รูปที่ 16 HSQC ของสารประกอบ 5



รูปที่ 17 HMBC ของสารประกอบ 5

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารประกอบ 6



รูปที่ 18 ^{1}H NMR ของสารประกอบ 6

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวญาณิศา มิตรภาพ เกิดเมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน พุทธศักราช 2534 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนก วิทย์ – คณิต จากโรงเรียนศรียาภัย จังหวัดชุมพร เมื่อปีการศึกษา 2552 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบปริญญาตรี 584 หมู่บ้านฉัตรแก้ว แฮปปี้แลนด์ ถนนสุขาภิบาล 1 แขวงคลองจั่น เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย