



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ      องค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากเปลือกมะดัน  
Chemical constituents and cytotoxicity from the bark of *Garcinia schomburgkiana*

ชื่อนิสิต            นางสาวกมลวรรณ มัดสิงห์

ภาควิชา            เคมี

ปีการศึกษา        2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากเปลือกมะดัน

Chemical constituents and cytotoxicity from the bark of *Garcinia schomburgkiana*

โดย

นางสาวกมลวรรณ มัดสิงห์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากเปลือกมะดัน

โดย นางสาวมลวรรณ มัดสิงห์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยวงศ์)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสมาวดี ไชยอนันต์สุจริต)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้

ชื่อโครงการ                      องค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากเปลือกมะดัน  
ชื่อนิติในโครงการ              นางสาวมลวรรณ มัดสิงห์                      เลขประจำตัว 5733052123  
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยวงศ์  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

### บทคัดย่อ

จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกมะดันมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีพบว่า แยกได้สารใหม่ในกลุ่มแซนโทน (xanthenes) 2 ชนิด คือ Schomburgone A (GS1) และ Schomburgone B (GS2) นอกจากนี้พบสารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 8 ชนิด คือ Isocudranixanthone B (GS3), Gerontoxanthone I (GS4), Nigrolineaxanthone E (GS5), Isojacarecubin (GS6), Dulxanthone A (GS7), Macluraxanthone (GS8), Vismiaquinone (GS9) และ 3-Geranylemodin (GS10) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางเทคนิคสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 พบว่าสาร GS3, GS4, GS5, GS6 และ GS8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งชนิด KB และ Hela S-3 ในระดับดี โดยมีค่า  $IC_{50}$  ในช่วง 1.46-7.95  $\mu M$

คำสำคัญ: เปลือกมะดัน, แซนโทน, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Project Title            Chemical constituents and cytotoxicity from the bark of *Garcinia schomburgkiana*

Student Name           Miss Kamonwan Mudsing           Student ID 5733052123

Advisor Name           Associate Professor Dr.Santi Tip-pyang

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

### Abstract

The bark of *Garcinia schomburgkiana* was extracted with dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). The dichloromethane crude extract was purified by chromatographic techniques which led to the isolation of two new xanthenes, Schomburgone A (**GS1**) and Schomburgone B (**GS2**), along with eight known compounds; Isocudranixanthone B (**GS3**), Gerontoxanthone I (**GS4**), Nigrolineaxanthone E (**GS5**), Isojacarecubin (**GS6**), Dulxanthone A (**GS7**), Macluraxanthone (**GS8**), Vismiaquinone (**GS9**) and 3-Geranylemodin (**GS10**). Their structures were determined by spectroscopic methods as well as comparison with previous reports in the literature. All isolated compounds were evaluated for their cytotoxicity against KB and HeLa S-3 cell lines. Compounds **GS3**, **GS4**, **GS5**, **GS6** and **GS8** showed good cytotoxicity against both KB and HeLa S-3 cells with IC<sub>50</sub> values in the range of 1.46-7.95  $\mu$ M.

Keywords: *Garcinia schomburgkiana*, xanthenes, cytotoxicity

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยและรายงานฉบับจะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูง ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยวงศ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา ถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆ ตลอดจนปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ ในรายงานฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภวิทย์ ไชยอนันต์สุจริต ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติเป็นประธาน และกรรมการสอบงานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงให้คำแนะนำ และข้อสงสัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.สุทิน แก่นนาคำ ภาควิชาเคมี ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำแนวทาง เทคนิคการวิจัย เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดจนการปรับปรุงและตรวจสอบรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินการงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณกำลังใจจากพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาคเคมีทุกคน และขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนในทุกๆ เรื่องและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอนุมติ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญแผนภาพ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นมะดัน	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
<b>บทที่ 2 วิธีการทดลอง</b>	<b>9</b>
2.1 พืชตัวอย่าง	9
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	9
2.3 สารเคมี	10
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	10
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	11
2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	11
2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)	12
2.5.3 Sephadex LH-20 (Column Chromatography)	12
2.5.4 Radical chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron <sup>®</sup> )	13
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	14
2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	14
2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ	14
2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method	18
<b>บทที่ 3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้</b>	<b>19</b>
3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS1	19
3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS2	21
3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS3	23
3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS4	24
3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS5	24
3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS6	25
3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS7	26
3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS8	26
3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS9	27
3.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS10	28
3.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	29
<b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b>	<b>30</b>
ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้วิจัย	41





## สารบัญตาราง

## หน้า

ตารางที่ 3.1	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) ของสาร GS1	20
ตารางที่ 3.2	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) ของสาร GS2	22
ตารางที่ 3.3	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (GS1-GS10) และสารมาตรฐาน Doxorubicin	29



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1	ลักษณะของต้น ใบ ดอก และผลของต้นมะดัน	2
รูปที่ 1.2	สารที่สกัดได้จากแก่นไม้ของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	3
รูปที่ 1.3	สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	3
รูปที่ 1.4	สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	4
รูปที่ 1.5	สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	5
รูปที่ 1.6	สารที่สกัดได้จากลำต้นของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	6
รูปที่ 1.7	สารที่สกัดได้จากผลของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	7
รูปที่ 1.8	สารที่สกัดได้จากรากของต้น <i>Garcinia schomburgkiana</i>	8
รูปที่ 3.1	โครงสร้างสาร GS1	19
รูปที่ 3.2	ข้อมูล HMBC และ COSY ของโครงสร้างสาร GS1	20
รูปที่ 3.3	โครงสร้างสาร GS2	21
รูปที่ 3.4	ข้อมูล HMBC และ COSY ของโครงสร้างสาร GS2	22
รูปที่ 3.5	โครงสร้างสาร GS3	23
รูปที่ 3.6	โครงสร้างสาร GS4	24
รูปที่ 3.7	โครงสร้างสาร GS5	24
รูปที่ 3.8	โครงสร้างสาร GS6	25
รูปที่ 3.9	โครงสร้างสาร GS7	26
รูปที่ 3.10	โครงสร้างสาร GS8	26
รูปที่ 3.11	โครงสร้างสาร GS9	27
รูปที่ 3.12	โครงสร้างสาร GS10	28
รูปที่ 4.1	โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ GS1-GS10	31

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกมะดัน



## สารบัญภาคผนวก

		หน้า
รูปที่ 1	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ Schomburgone A (GS1) ใน $\text{CDCl}_3$	36
รูปที่ 2	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ Schomburgone A (GS1) ใน $\text{CDCl}_3$	36
รูปที่ 3	สเปกตรัม COSY ของ Schomburgone A (GS1) ใน $\text{CDCl}_3$	37
รูปที่ 4	สเปกตรัม HSQC ของ Schomburgone A (GS1) ใน $\text{CDCl}_3$	37
รูปที่ 5	สเปกตรัม HMBC ของ Schomburgone A (GS1) ใน $\text{CDCl}_3$	38
รูปที่ 6	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ Schomburgone B (GS2) ใน $\text{CDCl}_3$	38
รูปที่ 7	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ Schomburgone B (GS2) ใน $\text{CDCl}_3$	39
รูปที่ 8	สเปกตรัม COSY ของ Schomburgone B (GS2) ใน $\text{CDCl}_3$	39
รูปที่ 9	สเปกตรัม HSQC ของ Schomburgone B (GS2) ใน $\text{CDCl}_3$	40
รูปที่ 10	สเปกตรัม HMBC ของ Schomburgone B (GS2) ใน $\text{CDCl}_3$	40



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

UV	ultraviolet
NMR	nuclear magnetic resonance
TLC	thin layer chromatography
IC <sub>50</sub>	the half maximal inhibitory concentration
$\mu\text{g/ml}$	microgram per milliliter
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{L}$	microliter
L	Liter
M	molar
$J$	coupling constant (Hz)
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
s	singlet (NMR)
d	doublet (NMR)
t	triplet (NMR)
dd	doublet of doublets (NMR)
m	multiplet (NMR)
m/z	mass per charge number of ions (mass spectroscopy)
HRESIMS	high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
$\lambda_{\text{max}}$	maximum absorbance wavelength (ultraviolet spectroscopy)
$\delta_{\text{H}}$	chemical shift of proton (NMR)
$\delta_{\text{C}}$	chemical shift of carbon (NMR)
DMSO	dimethyl sulfoxide
CDCl <sub>3</sub>	deuterated chloroform
<sup>1</sup> H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
<sup>13</sup> C-NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	correlation spectroscopy
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation

## บทที่ 1

### บทนำ

มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติหรือมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ จากการสำรวจมีผู้ป่วยและเสียชีวิตจากโรคมะเร็งจำนวนมากขึ้น มะเร็งที่พบในร่างกายมีมากกว่า 100 ชนิด มะเร็งแต่ละชนิดมีกลไกของโรคมะเร็งที่ไม่เหมือนกัน จึงมีวิธีการรักษาที่แตกต่างกัน ทำให้มีการศึกษาวิจัยยาหรือสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง จากส่วนประกอบต่างๆของพืช และสมุนไพรที่มีตามธรรมชาติหลากหลายชนิด [1,2] รวมทั้งพืชสกุล *Garcinia* ซึ่งเป็นพืชที่แพร่กระจายไปทั่วเขตร้อนส่วนใหญ่มีสารกลุ่ม xanthone เป็นองค์ประกอบหลัก จัดเป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ พบว่าพืชสกุล *Garcinia* มีสมบัติทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ต้านเซลล์มะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ ต้านโรคเอดส์ บรรเทาอาการโรคเบาหวาน โรคบิด โรคกรดสีดวงทวาร ท้องร่วงเรื้อรัง พยาธิตัวตืด [3,4] จึงเป็นพืชสกุลที่มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากเปลือกมะดัน โดยผู้วิจัยคาดว่าจะพบสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์ได้

#### 1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นมะดัน

ต้นมะดัน (*Garcinia schomburgkiana*) เป็นพืชที่อยู่ในสกุลมังคุดหรือ *Garcinia* จัดอยู่ในวงศ์ Clusiaceae สามารถพบในบริเวณใกล้แหล่งน้ำ หรือในสวนครัวเรือน เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย กัมพูชา ลาว เวียดนาม เป็นต้น [5] ลักษณะของต้นมะดันเป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ เนื้อไม้ค่อนข้างเหนียว ต้นเขียวชอุ่มขนาดเล็ก สูงประมาณ 3-7 เมตร แตกกิ่งก้านออกเป็นพุ่ม ลักษณะของเปลือกต้นจะเรียบ สีน้ำตาลอมดำ ใบมะดันเป็นใบเดี่ยว แทงออกเป็นคู่ตรงข้ามกันบนกิ่ง กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 5-9 เซนติเมตร มีรูปร่างค่อนข้างรียาว รูปขอบขนาน ขอบใบเรียบออกเรียงสลับกัน โคนใบและปลายใบแหลม แผ่นใบเรียบลื่น เนื้อใบค่อนข้างหนา ใบมีสีเขียวสดถึงเขียวแก่ตามอายุใบ ใบอ่อนจะแตกออกในช่วงต้นฤดูฝน ดอกมะดัน เป็นดอกเดี่ยวหรือออกดอกเป็นช่อ แทงออกตามง่ามใบ แต่ละช่อมีดอกประมาณ 3-6 ดอก โดยดอกมีสีเหลืองอมส้ม มีทั้งดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้ มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ค่อนข้างกลม กลีบดอกมี 4 กลีบ คล้ายรูปแฉกรูปไข่ ส่วนปลายกลีบจะมน และดอกเพศจะมีเกสรเพศผู้อยู่ 10-12 อัน ผลมะดัน หรือลูกมะดัน ลักษณะของผลจะคล้ายรูปรีปลายแหลม สีเขียว ผิวเรียบมันลื่น มีรสเปรี้ยวถึงเปรี้ยวจัด ด้านในผลมีเมล็ดประมาณ 3-4 เมล็ดติดกัน เมล็ดแข็งและขรุขระ โดยในผลจะมีวิตามินซีสูงและยังมีสารอาหารหรือสารสำคัญอย่างเบตาแคโรทีน รวมไปถึงแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส เป็นต้น [6]



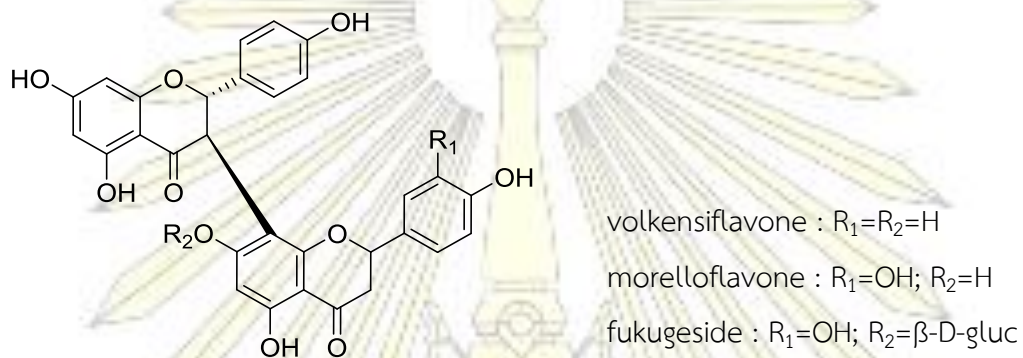
รูปที่ 1.1 ลักษณะของต้น ใบ ดอก และผลของต้นมะดัน [7,8]

ประเทศไทยมักนิยมนำต้นมะดันมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพร เนื่องจากทางเภสัชวิทยาพบว่ามะดันมีสารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก และมีสรรพคุณมากมาย ได้แก่ กระตุ้นการขับถ่าย แก้อาการเจ็บคอและขับเสมหะ ช่วยบรรเทาอาการเป็นหวัด ช่วยลดอาการน้ำลายเหนียว แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ ช่วยในการฟอกเลือด ใช้เป็นยาระบายอ่อนๆ ช่วยในการขับปัสสาวะ ช่วยกระตุ้นให้อุณหภูมิร่างกายทำให้เจริญอาหาร ช่วยกระตุ้นระบบการย่อยเพิ่มความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ช่วยระงับกลิ่นปากจากความเปรี้ยวที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ในปากได้ และรสชาติเปรี้ยวของผลมะดันมีสรรพคุณกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทแก้อาการง่วงนอน [9]

## 1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

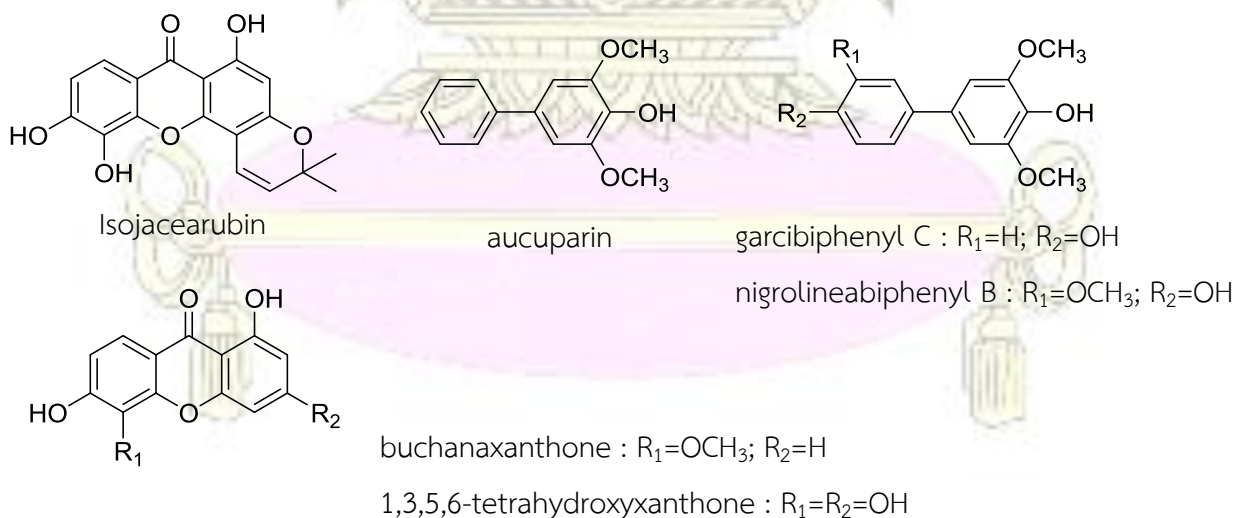
จากงานวิจัยของพืช *Garcinia schomburgkiana* ส่วนใหญ่จะพบสารในกลุ่ม xanthenes, depsidones, benzophenones, biphenyls, biflavonoides, steroids และ benzoylphloroglucinols ดังรายงานต่อไปนี้

Häfner และคณะ (1993) [10] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนแก่นไม้ด้วยอะซิโตน พบสาร 3 ชนิด คือ volkensiflavone, morelloflavone และ fukugeside



รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากแก่นไม้ของต้น *Garcinia schomburgkiana*

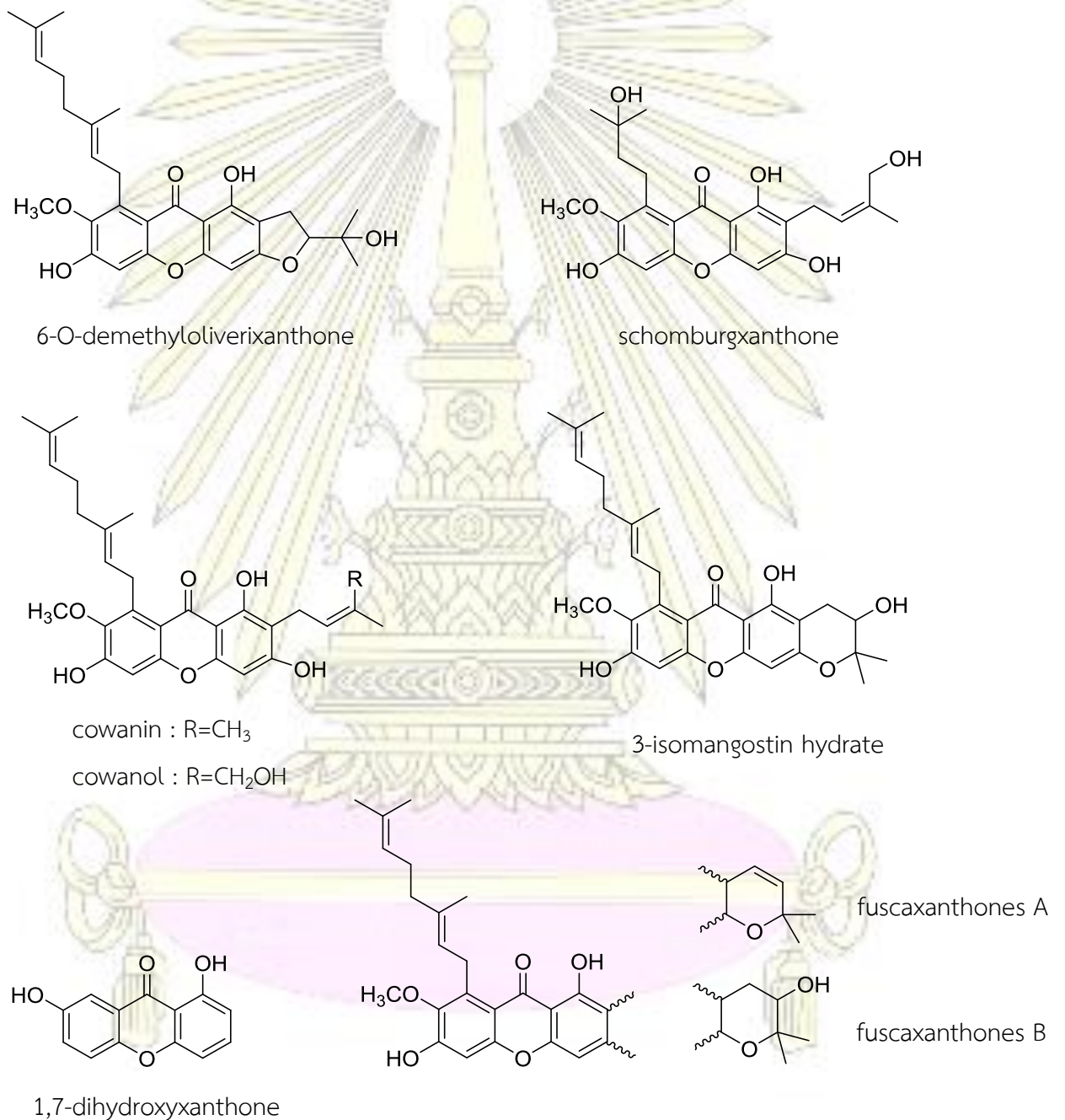
Mungmee และคณะ (2012) [11] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนเนื้อไม้ด้วยไดคลอโรมีเทน พบสารในกลุ่ม xanthenes 3 ชนิด คือ isojacearubin, buchanaxanthone และ 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone สารกลุ่ม biphenyls 3 ชนิด คือ garcibiphenyl C, aucuparin และ nigrolineabiphenyl B หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า isojacearubin มีฤทธิ์ความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) มีค่า  $IC_{50} < 0.001 \mu\text{g/ml}$



รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Garcinia schomburgkiana*

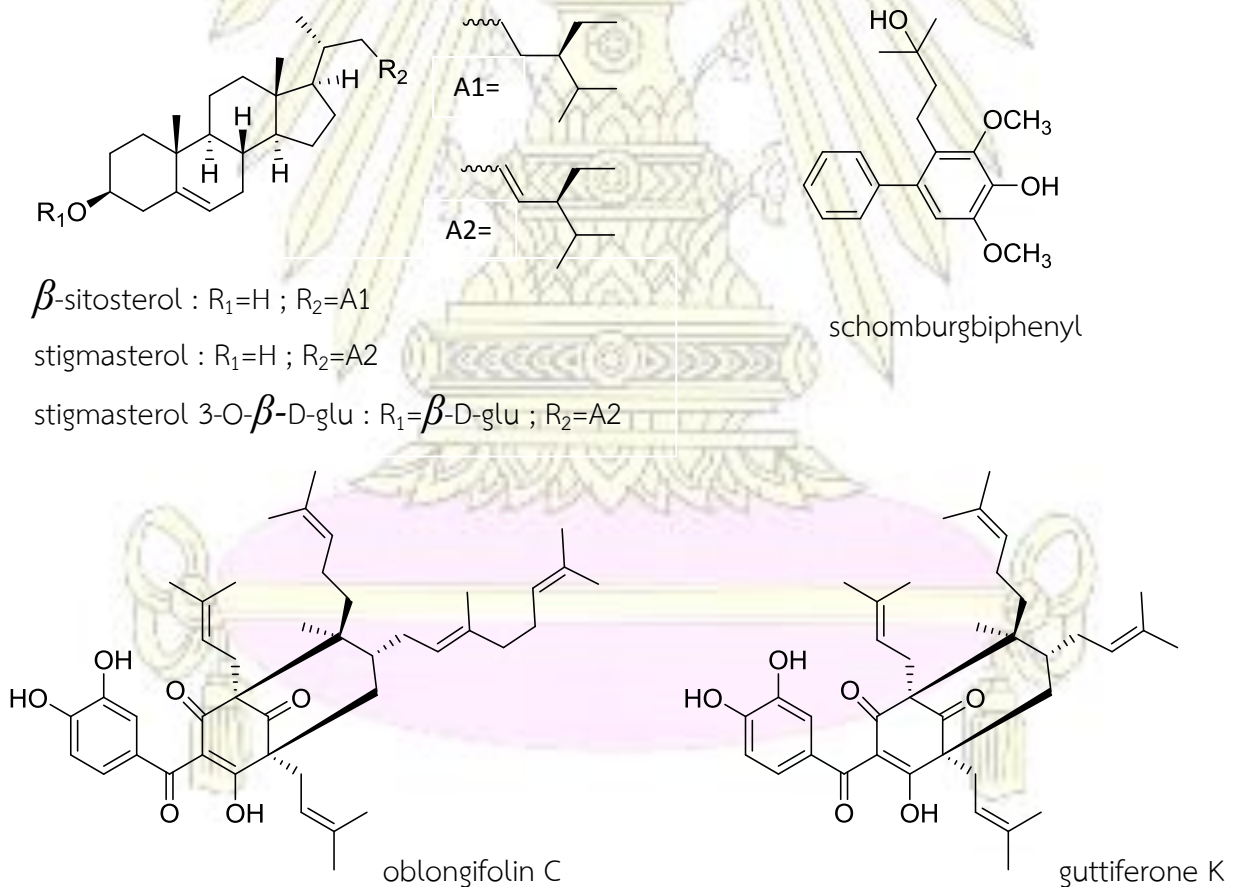


Hua และคณะ (2012) [12] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนเปลือกด้วยเอทิลอะซิเตท พบสารในกลุ่ม xanthenes ทั้งหมด 8 ชนิด แบ่งเป็นสารใหม่ 2 ชนิด คือ 6-O-demethyloliverixanthone และ schomburgxanthone สารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 6 ชนิด คือ cowanin, cowanol, fuscaxanthenes A และ B, 3-isomangostin hydrate และ 1,7-dihydroxyxanthone หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) พบว่า fuscaxanthenes B และ cowanin มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.4 และ 2.7  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ



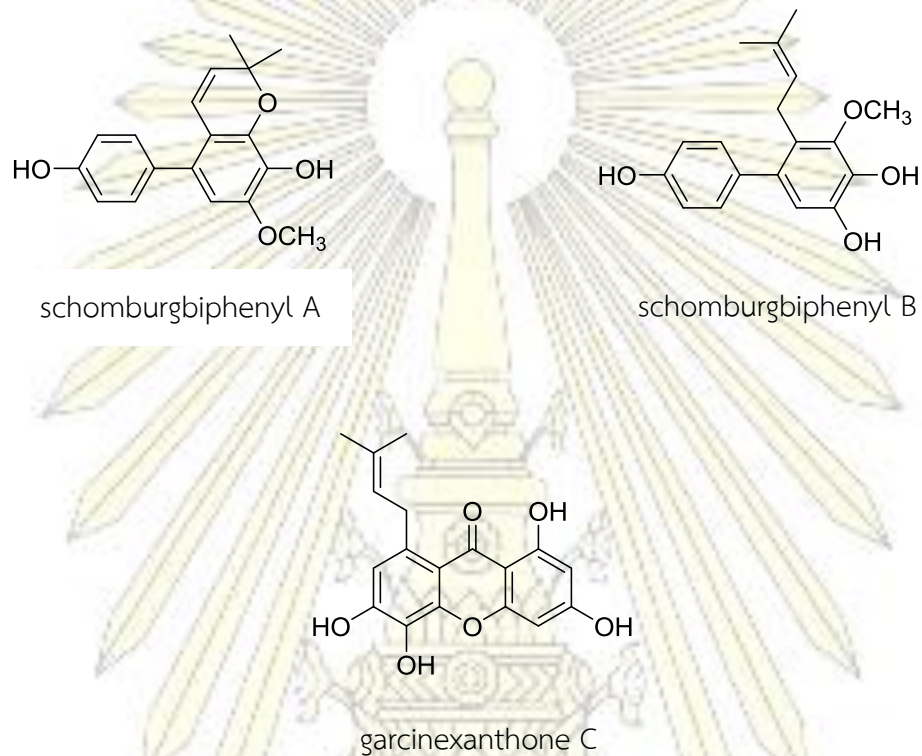
รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Garcinia schomburgkiana*

Mungmee และคณะ (2013) [13] แยกสารจากกิ่งสกัดในส่วนเนื้อไม้ด้วยเมทานอล พบสารใหม่ในกลุ่ม biphenyl 1 ชนิด คือ schomburgbiphenyl พร้อมกับสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 14 ชนิด โดยแบ่งเป็นกลุ่ม xanthones 3 ชนิด คือ isojacareubin, buchanaxanthone และ 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone กลุ่ม benzophenones 2 ชนิด คือ oblongifolin C และ guttiferone K กลุ่ม biphenyls 3 ชนิด คือ aucupari, nigrolineabiphenyl B และ garcibiphenyl C กลุ่ม biflavonoids 3 ชนิด คือ volkensiflavone, moreloflavone และ fukugiside และ steroids 3 ชนิด คือ  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol และ stigmasterol 3-O- $\beta$ -d-glucopyranoside หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ ลำไส้ (SW620) เต้านม (BT474) ตับ (HepG2) กระเพาะ (KATO-III) และปอด (CHAGO) พบว่า สาร oblongifolin C และ guttiferone K มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) มีค่า  $IC_{50} < 0.0015$  และ  $0.0017 \mu M$  ฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มีค่า  $IC_{50}$  1.09 และ  $0.13 \mu M$  ฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะ (KATO-III) มีค่า  $IC_{50}$  5.62 และ  $0.13 \mu M$  และฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) มีค่า  $IC_{50}$  1.06 และ  $0.10 \mu M$  ตามลำดับ สาร nigrolineabiphenyl B มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) มีค่า  $IC_{50}$   $0.36 \mu M$  สาร isojacareubin มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด คือ ลำไส้ (SW620) เต้านม (BT474) ตับ (HepG2) กระเพาะ (KATO-III) และปอด (CHAGO) มีค่า  $IC_{50}$   $< 0.0031$ , 2.76, 1.29, 3.22 และ  $1.75 \mu M$  ตามลำดับ



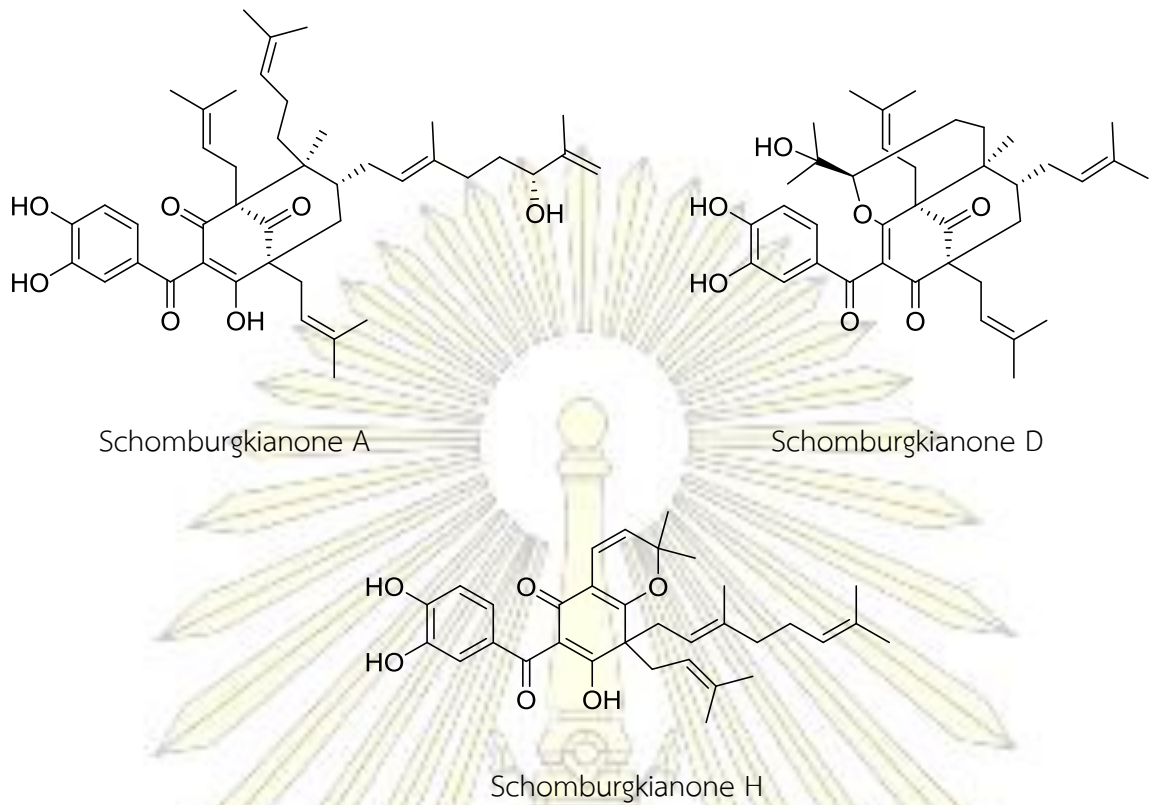
รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Garcinia schomburgkiana*

Ito และคณะ (2013) [14] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนลำต้นด้วยเอทิลอะซิเตท พบสารใหม่ในกลุ่ม biphenyls 2 ชนิด คือ schomburgbiphenyl A และ B สารที่มีรายงานมาแล้ว 5 ชนิด คือ oblongifolin C, garcinexanthone C, nigrolineabiphenyl A, nigrolineabiphenyl B และ garcibiphenyl C หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสาร oblongifolin C มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Jurkat, NALM6, K562 และ HPB-ALL มีค่า  $IC_{50}$  4.9, 3.7, 7.8 และ  $5.4 \mu M$  ตามลำดับ



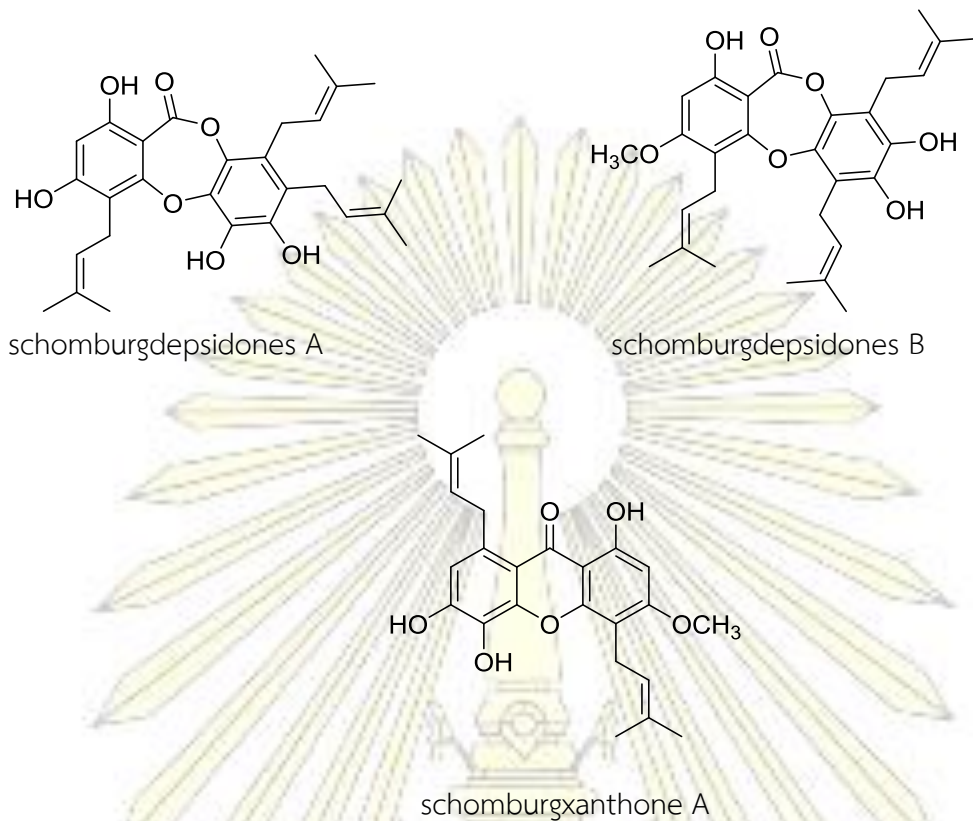
รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากลำต้นของต้น *Garcinia schomburgkiana*

Le และคณะ (2016) [15] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนผลด้วยเมทานอล พบสารกลุ่มใหม่ schomburgkianones 8 ชนิด คือ schomburgkianones A-H สารที่มีรายงานมาแล้วแบ่งเป็นสารกลุ่ม polyprenylated benzoylphloroglucinols 4 ชนิด คือ guttiferone K, oblongifolin C, garciyunnanin A และ garcicowin B สารกลุ่ม bioflavonoids 4 ชนิด หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารกลุ่ม polyprenylated benzoylphloroglucinols มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด DNA polymerases  $\alpha$  และ  $\lambda$  โดยมีค่า  $IC_{50}$  5.0-8.8  $\mu M$  และ สาร schomburgkianones A, schomburgkianones B, schomburgkianones D, schomburgkianones E, guttiferone K, oblongifolin C และ garciyunnanin A มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) โดยมีค่า  $IC_{50} < 10 \mu M$



รูปที่ 1.7 สารที่สกัดได้จากผลของต้น *Garcinia schomburgkiana*

Sukandar และคณะ (2016) [16] แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนรากด้วยไดคลอโรมีเทน พบสารใหม่ในกลุ่ม depsidones 2 ชนิด คือ schomburgdepsidones A และ B สารใหม่ในกลุ่ม xanthenes 1 ชนิด คือ schomburgxanthone A และสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 8 ชนิด คือ oliveridepsidone A, oliveridepsidone D, 1,5 -dihydroxyxanthone, nigrolineaxanthone E, 6 -desoxyjacareubin, aucuparin, 3-hydroxy-5-methoxybiphenyl และ methyl-2,6-dihydroxy-4-methoxy-3(3'-methyl-2'-butenyl)-benzoate หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า nigrolineaxanthone E มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด KB, Hela S-3 และ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  3.17–6.07  $\mu M$  และพบว่า schomburgxanthone A มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด KB มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 8.14  $\mu M$



รูปที่ 1.8 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Garcinia schomburgkiana*

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกมะดัน โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีด้วย ข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโตรเมตรี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี เป็นต้น รวมถึงนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าต้นมะดัน มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และมักมีการ รายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ อีกทั้งในรายงานที่ผ่านมาพบว่าส่วนเปลือกต้นมะดันยังมีงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อย ทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นมะดัน และศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งของพืชชนิดนี้ โดยผู้วิจัยคาดว่าจะพบสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ ในทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์ต่อไป

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกมะดัน
2. พิสูจน์ทราบเอกลักษณ์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

## บทที่ 2 วิธีการทดลอง

### 2.1 พิษตัวอย่าง

เปลือกมะดันที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เก็บมาจากเขตตลิ่งชัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อเดือน มิถุนายน ปี พ.ศ. 2560

### 2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

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

### 2.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) ไคลอโรฟอร์ม (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) เอทิลอะซิเตท (EtOAc) เมทานอล (MeOH) คลอโรฟอร์มดี (CDCl<sub>3</sub>) และอะซิโตน (Acetone)
2. ซิลิกาเจลเบอร์ 7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography)
3. แผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC) ชนิด PF254 ของบริษัท Merck ประเทศ เยอรมัน
4. Sephadex LH-20
5. Anisaldehyde reagent
6. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

### 2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จัดหาเปลือกมะดัน อุปกรณ์ และสารเคมี
2. นำเปลือกมะดันมาตากให้แห้ง บดให้มีขนาดเล็กลง สกัดด้วยตัวทำละลายไคลอโรฟอร์มเป็นเวลา 3 วัน
3. นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้ง (ระเหยตัวทำละลายออก) ตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดด้วย thin layer chromatography (TLC)
4. แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น silica gel, sephadex LH-20 column chromatography และ chromatotron เป็นต้น พร้อมศึกษาหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยแผ่น TLC หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ทำการแยกซ้ำโดยการเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่
5. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโทรเมตรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว
6. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
7. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

## 2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

### 2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets silica gel 60 F254 ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการกำหนดระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต่มีสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคะปิลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรอง และมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุด (solvent front) ที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยส่องด้วย UV Lamp ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในสารละลาย anisaldehyde/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> แล้วปิ้งบน hotplate อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

ก. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาด และมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตรปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การแต้มสาร นำแผ่น TLC มาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปด้านบน และขีดกำหนดระดับด้านล่างตรงตำแหน่งที่ต้องการแต้มสารจากนั้นใช้หลอดคะปิลารีจุ่มลงไปใส่สารละลายที่ต้องการทดสอบ แล้วแต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นที่ใช้ดินสอขีดไว้ ให้เป็นจุดวงกลมเล็กๆ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตรและแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร หลังจากที่ได้จุดสารที่แต้มแห้งสนิทแล้ว จึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้วทั้งนี้ระดับของจุดสารบน TLC ควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อยจากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ใช้ดินสอขีดไว้แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร

- นำแผ่น TLC ไปส่องกับแสง UV เพื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสง UV ของสาร
- ในกรณีที่สารไม่สามารถดูดกลืนแสง UV ให้แผ่น TLC ไปจุ่มลงใน anisaldehyde หรือใน conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> แล้วเป่าด้วยลมร้อนให้แห้งตำแหน่งที่มีสารจะปรากฏให้เห็น



### 2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)

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

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่แยกประมาณ 20 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก กล่าวคือ ในตอนแรกต้องทำการเขย่าของผสมระหว่างซิลิกาเจล กับตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำคัญตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการ และระดับซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกาเจล แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดควรระเหยตัวทำละลายให้เกือบแห้ง แล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจลเบอร์ 7734 โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ในการคลุกกับสารที่ต้องการแยก ให้นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้งก่อนใส่คอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์เติมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระแทกกระเทือนผิวหน้าของของผสม ขณะเติมตัวทำละลาย และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลาย ด้านบนในไซ จากนั้นจึงเริ่มเปลี่ยนตัวทำละลายชนิดใหม่ต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

### 2.5.3 Sephadex LH-20 (Column Chromatography)

เป็นเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเหลว ซึ่งเป็นการแยกสารให้บริสุทธิ์ตามขนาดของโมเลกุล ส่วนใหญ่ใช้ในการแยกของสารกลุ่ม steroids, terpenoids และ lipids เป็นต้น ใช้ตัวดูดซับ (Stationary Phase) คือ sephadex LH-20 ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก ใช้ตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล คนตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำคัญตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เท sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อให้ sephadex LH-20 อัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุ sephadex LH-20 ในระดับที่ต้องการ และระดับ sephadex LH-20 ไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับ sephadex LH-20 แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยละลายสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นใช้หลอดหยดดูดสารละลายที่ต้องการแยก แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ และเปิดให้ตัวทำละลาย

ไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลาย ด้านบนใส จากนั้นจึงเติมสารละลาย 50% ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ได้

#### 2.5.4 Radical chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron®)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ซึ่งจะมีหลักการทำงานคือ นำสารละลายของสารที่ต้องการแยกหยดลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลหนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ไซตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในกรวยแยก แล้วจึงเปิดเครื่องโดยแผ่นแก้วทรงกลมจะเกิดการหมุน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมขณะทำการแยก แล้วทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้ ดังนั้นข้อดีสำหรับเทคนิคนี้คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี กล่าวคือใช้เวลาประมาณ 20-30 นาทีเนื่องจากแรงจากการหมุนเหวี่ยงจะช่วยทำให้เกิดการแยกได้ดีและเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารที่แยกได้ทันทีโดยใช้ UV Lamp ทำให้ง่ายต่อการเก็บแฟรกชัน

ก. การเตรียมวัสดุภาคนิ่ง ซึ่งซิลิกาเจล หนัก 30.0 กรัม ผสมน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวจากนั้นนำไปเคลือบด้านบนแผ่นแก้วทรงกลม

ข. รอให้แผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลแห้งแล้วมาปรับความหนาของซิลิกาให้มีขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร

ค. เปิดเครื่องโครมาโททรอนแล้วหยดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ขณะกำลังหมุน

ง. ปล่อยให้ตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในเครื่องโครมาโททรอน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นแถบสารที่แยกได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมและทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้

## 2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

### 2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำเปลือกมะดันที่ตากแห้ง (2.0 กิโลกรัม) นำมาบดให้ละเอียด จากนั้นสกัดด้วย ไดคลอโรมีเทน ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

### 2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ

1. นำสิ่งสกัดเปลือกมะดันที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัดน้ำหนัก 91.03 กรัม

2. นำสิ่งสกัดได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลายผสม 0% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จนถึง 100% ไดคลอโรมีเทนและ 0% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 6 แพรกชัน (A-F)

3. นำสารแต่ละแพรกชัน (A-F) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

4. นำสารสกัดแต่ละแพรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

5. นำแพรกชัน A มาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 5 แพรกชัน (A<sub>1</sub>-A<sub>5</sub>) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแพรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% เอทิลอะซิเตท-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแพรกชัน A<sub>5</sub> น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำแพรกชัน A<sub>5</sub> มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 5% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแพรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS9**

7. นำแพรกชัน B มาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 5 แพรกชัน (B<sub>1</sub>-B<sub>5</sub>) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแพรกชันมาตรวจสอบด้วย

TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน  $B_5$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

8. นำแฟรกชัน  $B_5$  มาแยกซ้ำด้วย เทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน ( $B_{5.1}$ - $B_{5.2}$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน พบว่าแฟรกชันทั้ง  $B_{5.1}$  และ  $B_{5.2}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน  $B_{5.1}$  มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS10**
- นำแฟรกชัน  $B_{5.2}$  มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS2** และ **GS7**

9. นำแฟรกชัน C มาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน ( $C_1$ - $C_2$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน  $C_2$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

10. นำแฟรกชัน  $C_2$  มาแยกซ้ำด้วย เทคนิค sephadex LH-20 Column Chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน ( $C_{2.1}$ - $C_{2.2}$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 10% เอทิลอะซิเตท-เฮกเซน พบว่าแฟรกชัน  $C_{2.2}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน  $C_{2.2}$  มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เอทิลอะซิเตท-เฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS1**

11. นำแฟรกชัน D มาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 3 แฟรกชัน ( $D_1$ - $D_3$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน  $D_3$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

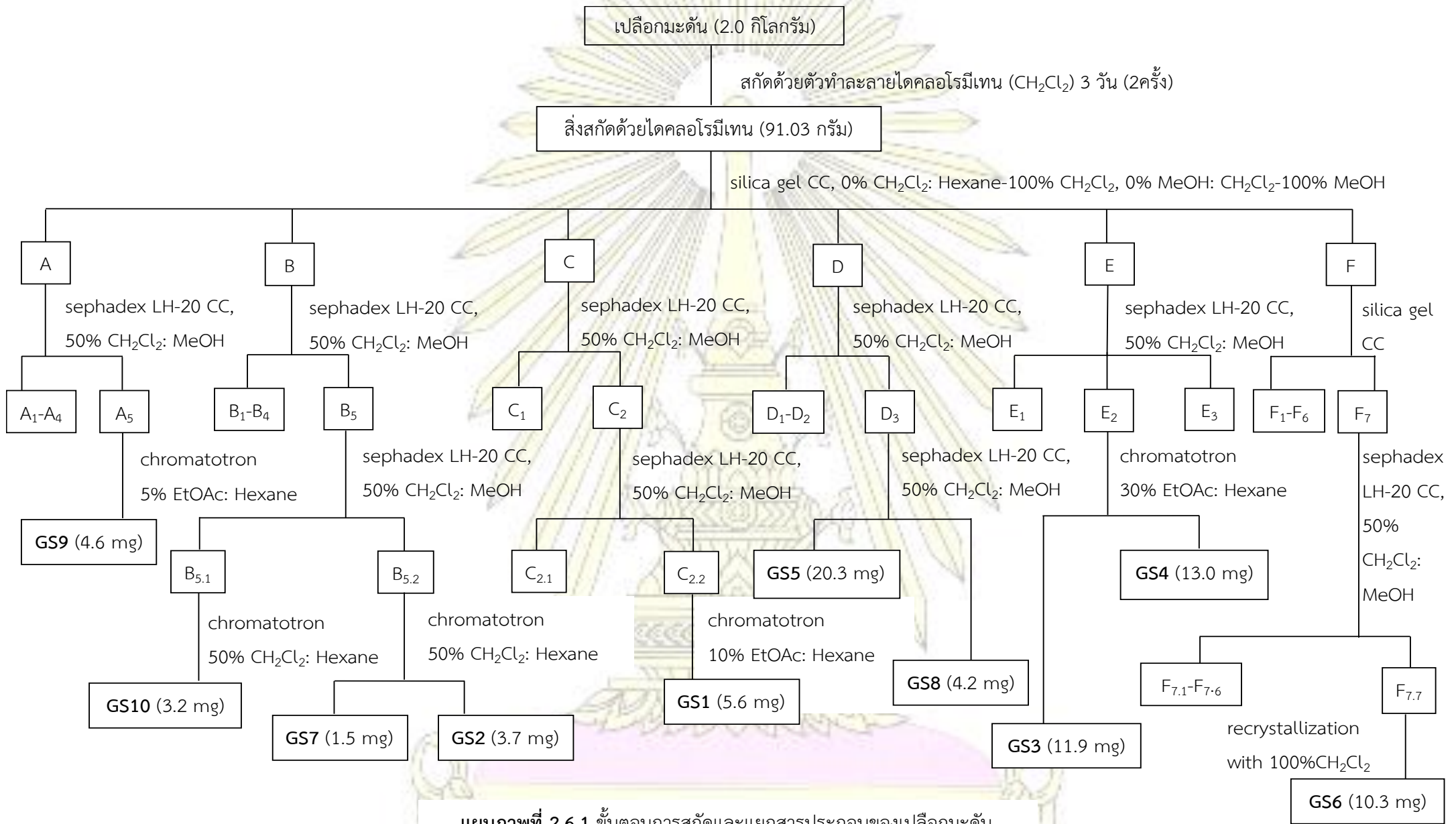
12. นำแฟรกชัน  $D_3$  มาแยกซ้ำด้วย เทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS5** และ **GS8**

13. นำแฟรกชัน E มาแยกด้วยเทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 3 แฟรกชัน ( $E_1$ - $E_3$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 100% ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน  $E_2$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

14. นำแฟรกชัน  $E_2$  มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 30% เอทิลอะซิเตท-เฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS3** และ **GS4**

15. นำแฟรกชัน F มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลายผสม 0% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จนถึง 100% ไดคลอโรมีเทนและ 0% เอทิลอะซิเตท-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตท โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 22 แฟรกชัน ( $F_1$ - $F_{22}$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% และ 10% เอทิลอะซิเตท-ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน  $F_7$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

16. นำแฟรกชัน  $F_7$  มาแยกซ้ำด้วย เทคนิค sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 7 แฟรกชัน ( $F_{7.1}$ - $F_{7.7}$ ) จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% เอทิลอะซิเตท-ไดคลอโรมีเทน พบว่าแฟรกชัน  $F_{7.7}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ จึงนำ  $F_{7.7}$  มาตกผลึกซ้ำ (recrystallization) ด้วยตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **GS6**



แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัดและแยกสารประกอบของเปลือกมะดัน

## 2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method [17]

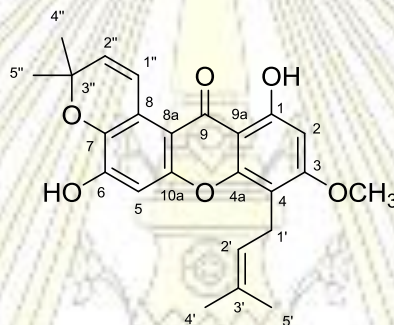
1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 ให้ได้ความเข้มข้น  $3 \times 10^3$  เซลล์ ใน  $200 \mu\text{L}$  ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งมี 5% ปริมาตรต่อปริมาตร fetal calf serum เป็นองค์ประกอบ
2. เติมเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไป ใน 96-well culture plate
3. นำเซลล์มะเร็งที่อยู่ใน 96-well culture plate มาบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
4. เติมสารบริสุทธิ์ที่ต้องการจะทดสอบและสารมาตรฐาน Doxorubicin ลงไปที่ความเข้มข้นต่างๆ  $2 \mu\text{L}$  ต่อ 1 หลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
5. เติม  $10 \mu\text{L}$  ของสารละลาย 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ที่ความเข้มข้น  $5 \text{ mg/ml}$  ลงไป บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  96 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่เหลือมาละลายด้วย  $150 \mu\text{L}$  DMSO และเติม  $0.1 \text{ M}$  glycine ปริมาตร  $25 \mu\text{L}$  ลงไป
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $540 \text{ nm}$  โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$

### บทที่ 3

#### การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการทดลองพบว่าการสกัดสารจากแฟรกชัน A-F ของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากเปลือกมะดัน พบว่าสามารถแยกสารทั้งหมด 10 ชนิด โดยเป็นสารใหม่ 2 ชนิด และสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว 8 ชนิด สำหรับการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จะอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอน ( $^1\text{H-NMR}$ ) และคาร์บอน ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) กับสารที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้

#### 3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS1

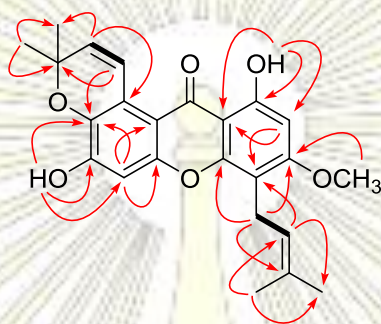


รูปที่ 3.1 โครงสร้างสาร GS1

สาร GS1 ลักษณะทางกายภาพเป็นน้ำมันสีเหลือง มวลโมเลกุลเท่ากับ  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_6$  จากการวัด HRESIMS พบไอออนพีคที่ ( $m/z$ ) 407.1527 [ $\text{M-H}$ ] $^+$  (จากการคำนวณ  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{O}_6$  ได้ 407.1495) UV สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่  $\lambda_{\text{max}}$  395 315 และ 243 nm ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารในกลุ่ม xanthone[18] จาก IR สเปกตรัมแสดงหมู่ hydroxyl ที่พีค  $3422\text{ cm}^{-1}$  และหมู่ carbonyl ที่พีค  $1632\text{ cm}^{-1}$  จาก  $^1\text{H NMR}$  สเปกตรัมแสดงว่ามีหมู่แทนที่ 3,3-dimethylallyl โดยยืนยันจากค่า chemical shift ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.67 (3H, s, H-4') และ 1.85 (3H, s, H-5') เป็นของหมู่ vinyl methyl ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.20 (1H, t,  $J=7.2$ , H-2') เป็นโปรตอนของหมู่ vinylic ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.44 (2H, d,  $J=7.2$ , H-1') เป็นโปรตอนของ benzylic บนหมู่ prenyl นอกจากนี้ค่า chemical shift ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.89 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3) เป็นสัญญาณของหมู่ methoxy  $\delta_{\text{H}}$  6.26 (1H, s, OH-6) สัญญาณหมู่ hydroxyl  $\delta_{\text{H}}$  6.33 (1H, s, H-2) และ 6.85 (1H, s, H-6) สัญญาณของโปรตอนวงอะโรมาติก  $\delta_{\text{H}}$  13.38 (1H, s, OH-1) สัญญาณของ hydrogen bonded hydroxyl ส่วนค่า chemical shift ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.50 (6H, s, H-4'' และ H-5''), 5.83 (1H, d,  $J=10.2$ , H-2'') และ 8.02 (1H, d,  $J=10.2$ , H-1'') เป็นสัญญาณของหมู่ dimethylchromene จากข้อมูล HMBC พบว่าตำแหน่ง H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  8.02) มีความสัมพันธ์กับ



C-7 แสดงว่าวง chromene เกาะที่ตำแหน่ง C-7 และ C-8 จากข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร **GS1** กับสาร paxanthon B [19] พบว่ามีความใกล้เคียงกัน ยกเว้นหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3 ถูกแทนที่ด้วยหมู่ methoxy โดยการยืนยันจากข้อมูลของ HMBC พบว่าโปรตอน methoxy ที่ H-3 พบสัญญาณคาร์บอนของ C-3 ที่  $\delta_c$  163.5 ดังนั้น สาร **GS1** เป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยให้ชื่อว่า Schomburgone A



รูปที่ 3.2 ข้อมูล HMBC และ COSY ของโครงสร้างสาร **GS1**

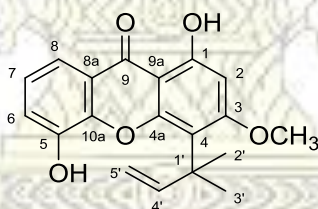
ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) และ  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) ของสาร **GS1**

ตำแหน่ง	สาร <b>GS1</b> ( $\text{CDCl}_3$ )		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1	-	162.0	-
2	6.33 (1H, s)	94.1	C-1, C-3, C-4, C-9a
3	-	163.5	-
4	-	107.2	-
4a	-	153.7	-
5	6.85 (1H, s)	102.6	C-6, C-7, C-8a, C-9a
6	-	151.1	-
7	-	136.9	-
8	-	119.9	-
8a	-	108.5	-
9	-	183.0	-
9a	-	103.9	-
10a	-	153.5	-
1'	3.44 (2H, d, $J = 7.2$ Hz)	21.7	C-3, C-4, C-4a, C-2', C-3'

ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) ของสาร GS1 (ต่อ)

2'	5.20 (1H, t, $J = 7.2$ Hz)	122.4	C-4, C-4', C-5'
3'	-	131.7	-
4'	1.67 (3H, s)	25.9	C-2', C-3', C-5'
5'	1.85 (3H, s)	18.0	C-2', C-3', C-4'
1''	8.02 (1H, d, $J = 10.2$ Hz)	121.2	C-7, C-3''
2''	5.83 (1H, d, $J = 10.2$ Hz)	132.5	C-8, C-3''
3''	-	77.1	-
4''	1.50 (3H, s)	27.5	-
5''	1.50 (3H, s)	27.5	C-2'', C-3'', C-4''
1-OH	13.38 (1H, s)	-	C-1, C-2, C-9a
6-OH	6.26 (1H, s)	-	C-5, C-6, C-7
3-OCH <sub>3</sub>	3.89 (3H, s)	56.1	C-3

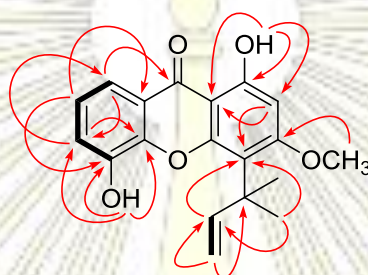
### 3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS2



รูปที่ 3.3 โครงสร้างสาร GS2

สาร GS2 ลักษณะทางกายภาพเป็นน้ำมันสีเหลือง มวลโมเลกุลเท่ากับ  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$  จากการวัด HRESIMS พบไอออนพิกที่ ( $m/z$ ) 325.1098 [ $\text{M-H}$ ]<sup>+</sup> (จากการคำนวณ  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_5$  ได้ 325.1076) UV สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่  $\lambda_{\text{max}}$  394 315 และ 244 nm ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารในกลุ่ม xanthone[18] จาก IR สเปกตรัมแสดงหมู่ hydroxyl ที่พิก 3422  $\text{cm}^{-1}$  และหมู่ carbonyl ที่พิก 1632  $\text{cm}^{-1}$  จาก  $^1\text{H NMR}$  สเปกตรัมแสดงว่ามีหมู่แทนที่ 1,1-dimethylallyl โดยยืนยันจากค่า Chemical shift ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.61 (6H, s, H-4' และ H-5') เป็นของหมู่ methyl ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.70 (1H, dd,  $J=10.6, 17.7$ , H-2') เป็นโปรตอนของ methane ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.07 (1H, d,  $J=10.6$ , H-3') และ 5.22 (1H, d,  $J=17.7$ , H-3') เป็นโปรตอนของ methylene นอกจากนี้พบค่า chemical shift ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.91 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-3) เป็นสัญญาณหมู่ methoxy ที่

$\delta_{\text{H}}$  6.42 (1H, s, OH-5) สัญญาณหมู่ hydroxyl ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.43 (1H, s, H-2) สัญญาณโปรตอนบนวงอะโรมาติก ค่า  $\delta_{\text{H}}$  7.23 (1H, t,  $J=7.6$ , H-7), 7.26 (1H, d,  $J=7.6$ , H-6) และ 7.71 (1H, d,  $J=7.6$ , H-8) แสดงค่าโปรตอนบนวงอะโรมาติก A จากข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร **GS2** กับสาร pancixanthone-A [20] พบว่ามีความใกล้เคียงกัน ยกเว้นหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3 ถูกแทนที่ด้วยหมู่ methoxy โดยการยืนยันจากข้อมูลของ HMBC พบว่าโปรตอน methoxy ที่ H-3 พบสัญญาณคาร์บอนของ C-3 ที่  $\delta_{\text{C}}$  166.1 ดังนั้น สาร **GS2** เป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยให้ชื่อว่า Schomburgone B



รูปที่ 3.4 ข้อมูล HMBC และ COSY ของโครงสร้างสาร **GS2**

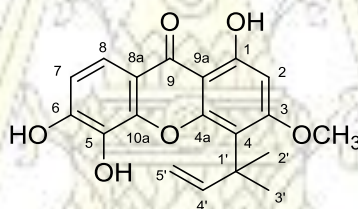
ตารางที่ 3.2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) และ  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) ของสาร **GS2**

ตำแหน่ง	สาร <b>GS2</b> (CDCl <sub>3</sub> )		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1	-	163.0	-
2	6.43 (1H, s)	96.2	C-1, C-3, C-4, C-9a
3	-	166.1	-
4	-	113.9	-
4a	-	154.0	-
5	-	145.9	-
6	7.26 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	120.3	C-8, C-10a
7	7.23 (1H, t, $J = 7.6$ Hz)	124.6	C-5, C-8a
8	7.71 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	116.6	C-6, C-9, C-10a
8a	-	121.0	-
9	-	182.0	-
9a	-	104.1	-

ตารางที่ 3.2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) ของสาร GS2 (ต่อ)

10a	-	144.8	-
1'	-	42.0	-
2'	6.70 (3H, dd, $J = 10.6, 17.7$ Hz)	156.3	C-1', C-5', C-4
3'	5.22, 5.07 (3H, d, $J = 10.6, 17.7$ Hz)	104.5	C-1', C-2'
4'	1.61 (1H, s)	28.4	-
5'	1.61 (2H, s)	28.4	C-1', C-2', C-4', C-4
1-OH	13.25 (1H, s)	-	C-1, C-2, C-9a
5-OH	6.42 (1H, s)	-	C-5, C-6, C-10a
3-OCH <sub>3</sub>	3.91 (3H, s)	56.2	C-3

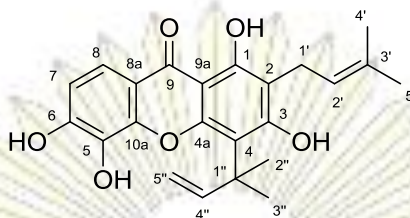
### 3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS3



รูปที่ 3.5 โครงสร้างสาร GS3

สาร GS3 ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  13.64 (1H, s, 1-OH), 7.98 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-8), 6.94 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.37 (1H, dd,  $J = 17.6, 10.6$  Hz, H-4'), 6.33 (1H, s, H-2), 5.52 (1H, dd,  $J = 17.6, 1.0$  Hz, H-5'), 5.35 (1H, dd,  $J = 10.6, 1.0$  Hz, H-5'), 4.20 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 1.91 (3H, s, H-2'), 1.91 (3H, s, H-3');  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{C}}$  181.9 (C-9), 166.2 (C-3), 162.5 (C-1), 157.0 (C-4a), 152.1 (C-6), 148.8 (C-4'), 146.4 (C-10a), 131.2 (C-5), 117.7 (C-8), 115.5 (C-8a), 114.2 (C-4), 112.8 (C-7), 111.4 (C-5'), 103.4 (C-9a), 95.8 (C-2), 55.9 (3-OCH<sub>3</sub>), 41.7 (C-1'), 28.0 (C-2'), 28.0 (C-3') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  ของสาร GS3 กับสาร Isocudranixanthone B พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร GS3 คือ Isocudranixanthone B [21]

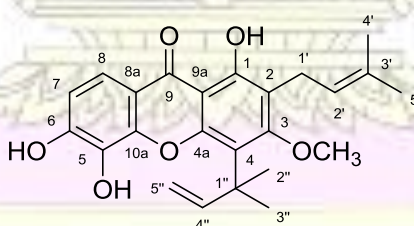
### 3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS4



รูปที่ 3.6 โครงสร้างสาร GS4

สาร **GS4** ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลืองเข้ม จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  13.62 (1H, s, 1-OH), 7.70 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-8), 6.94 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.68 (1H, dd,  $J = 17.7, 10.6$  Hz), 5.30 (1H, d,  $J = 17.7$  Hz, H-5'), 5.24 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-2'), 5.15 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz, H-5''), 3.47 (2H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-1'), 1.86 (3H, s, H-4'), 1.79 (3H, s, H-5'), 1.68 (3H, s, H-2''), 1.68 (3H, s, H-3'');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{C}}$  180.7 (C-9), 162.9 (C-1), 161.3 (C-3), 154.8 (C-4a), 153.7 (C-6), 148.8 (C-4''), 146.8 (C-10a), 136.0 (C-5), 130.8 (C-3'), 121.0 (C-2), 117.5 (C-8), 114.6 (C-8a), 112.4 (C-7), 110.8 (C-5''), 105.9 (C-2), 104.9 (C-9a), 41.5 (C-1''), 27.9 (C-2''), 27.9 (C-3''), 25.7 (C-5'), 21.5 (C-1'), 17.8 (C-4') เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร **GS4** กับสาร Gerontoxanthone I พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS4** คือ Gerontoxanthone I [22]

### 3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS5

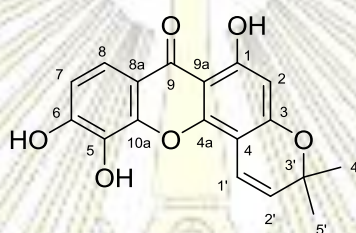


รูปที่ 3.7 โครงสร้างสาร GS5

สาร **GS5** ลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  13.34 (1H, s, 1-OH), 7.73 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-8), 6.97 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-7), 6.64 (1H, dd,  $J = 17.6, 10.7$  Hz, H-4''), 5.31 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-2'), 5.26 (1H, d,  $J = 17.6$  Hz, H-5''), 5.06 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz, H-5'), 3.79 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.43 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-1'), 1.81 (3H, s, H-4'), 1.73 (3H, s, H-5'), 1.69 (3H, s, H-2''), 1.69 (3H, s, H-3'');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );

$\delta_c$  181.4 (C-9), 164.6 (C-3), 160.2 (C-1), 156.8 (C-4'), 152.9 (C-4a), 149.4 (C-6), 144.9 (C-10a), 132.3 (C-3'), 131.1 (C-5), 122.7 (C-2'), 118.8 (C-4), 118.6 (C-2), 117.9 (C-8), 113.9 (C-8a), 113.0 (C-7), 105.8 (C-9a), 104.5 (C-5'), 62.8 (3-OCH<sub>3</sub>), 42.1 (C-1'), 28.9 (C-2'), 28.9 (C-3'), 25.8 (C-5'), 23.0 (C-1'), 18.1 (C-4') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และ <sup>13</sup>C NMR ของสาร **GS5** กับสาร Nigrolineaxanthone E พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS5** คือ Nigrolineaxanthone E [23]

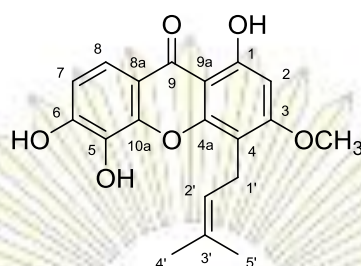
### 3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **GS6**



รูปที่ 3.8 โครงสร้างสาร **GS6**

สาร **GS6** ลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Acetone);  $\delta_H$  13.31 (1H, s, 1-OH), 7.65 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-8), 7.06 (1H, d,  $J$  = 10.1 Hz, H-1'), 7.01 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-7), 6.16 (1H, s, H-2), 5.75 (1H, d,  $J$  = 10.1 Hz, H-2'), 1.48 (3H, s, H-4'), 1.48 (3H, s, H-4'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Acetone);  $\delta_c$  181.4 (C-9), 164.2 (C-1), 161.2 (C-3), 155.6 (C-6), 152.8 (C-6), 144.9 (C-10a), 132.5 (C-5), 128.0 (C-2), 117.7 (C-8), 115.9 (C-1'), 115.1 (C-8a), 113.9 (C-7), 103.7 (C-4), 103.2 (C-9a), 99.5 (C-2), 78.9 (C-3'), 29.0 (C-4'), 29.0 (C-5') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และ <sup>13</sup>C NMR ของสาร **GS6** กับสาร Isojacareubin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS6** คือ Isojacareubin [24]

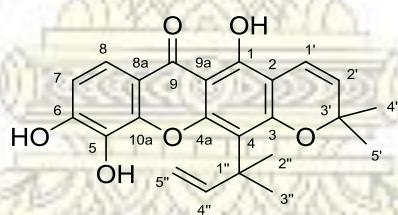
### 3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS7



รูปที่ 3.9 โครงสร้างสาร GS7

สาร **GS7** ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  13.16 (1H, s, 1-OH), 7.61 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-8), 6.80 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-7), 6.44 (1H, s, H-2), 5.61 (1H, m, H-2'), 3.95 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.54 (2H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1'), 1.90 (3H, s, H-5'), 1.58 (3H, s, H-4');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{C}}$  181.7 (C-9), 164.8 (C-3), 163.1 (C-1), 154.8 (C-4a), 153.2 (C-6), 147.42 (C-10a), 133.8 (C-5), 131.7 (C-3'), 123.4 (C-2'), 117.3 (C-8), 114.4 (C-8a), 113.6 (C-7), 108.6 (C-4), 103.2 (C-9a), 94.8 (C-2), 53.6 (3-OCH<sub>3</sub>), 25.9 (C-5'), 22.2 (C-1'), 17.9 (C-4') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร **GS7** กับสาร Dulxanthone A พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS7** คือ Dulxanthone A [25]

### 3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS8

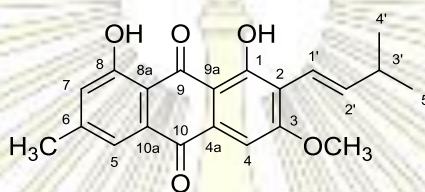


รูปที่ 3.10 โครงสร้างสาร GS8

สาร **GS8** ลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  13.53 (1H, s, 1-OH), 7.69 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-8), 6.95 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.76 (1H, dd,  $J = 10.3, 3.4$  Hz, H-4''), 6.72 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz, H-1'), 5.62 (1H, d,  $J = 9.9$  Hz, H-2'), 5.22 (1H, d,  $J = 17.7$  Hz, H-5''), 5.05 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz, H-5''), 1.65 (3H, s, H-2''), 1.65 (3H, s, H-3''), 1.51 (3H, s, H-4'), 1.51 (3H, s, H-5');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{C}}$  180.9 (C-9), 159.1 (C-3), 156.9 (C-1), 154.3 (C-6), 152.8 (C-4''), 144.7 (C-10a), 131.2 (C-5), 127.3 (C-2'), 117.7 (C-8), 116.3

(C-1'), 113.9 (C-8a), 113.2 (C-4), 112.9 (C-7), 109.1 (C-5'), 105.7 (C-2), 103.5 (C-9a), 78.4 (C-3'), 41.6 (C-1''), 28.4 (C-2''), 28.4 (C-3''), 28.1 (C-4'), 28.1 (C-5') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร **GS8** กับสาร Macluraxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS8** คือ Macluraxanthone [26]

### 3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **GS9**

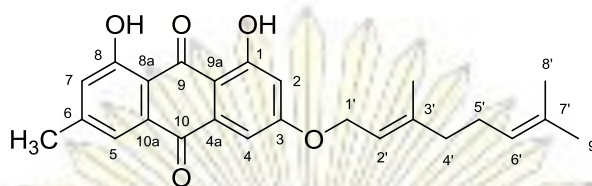


รูปที่ 3.11 โครงสร้างสาร **GS9**

สาร **GS9** ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีแดง จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  7.61 (1H, s, H-5), 7.41 (1H, s, H-4), 7.07 (1H, s, H-7), 6.92 (1H, dd,  $J = 16.3, 7.2$  Hz, H-2'), 6.66 (1H, d,  $J = 16.6$  Hz, H-1'), 4.04 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 2.52 (1H, m, H-3'), 2.45 (3H, s, 6-CH<sub>3</sub>), 1.14 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-4'), 1.14 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-5');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{C}}$  191.9 (C-9), 163.5 (C-3), 162.9 (C-8), 162.6 (C-1), 148.9 (C-6), 147.3 (C-10a), 142.4 (C-2'), 139.5 (C-4a), 124.9 (C-7), 121.6 (C-5), 118.9 (C-2), 116.3 (C-1'), 113.2 (C-8a), 108.6 (C-4), 103.9 (C-9a), 77.8 (C-3'), 56.8 (3-OCH<sub>3</sub>), 30.2 (C-4'), 30.2 (C-5'), 22.6 (C-6) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร **GS9** กับสาร Vismiaquinone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS9** คือ Vismiaquinone [27]



### 3.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร GS10



รูปที่ 3.12 โครงสร้างสาร GS10

สาร **GS10** ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีส้ม จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{H}}$  12.25 (1H, s, 1-OH), 12.09 (1H, s, 8-OH), 7.58 (1H, s, H-5), 7.33 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-4), 7.04 (1H, s, H-7), 6.64 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-2), 5.47 (1H, t,  $J = 6.3$  Hz, H-2'), 5.08 (1H, t,  $J = 5.9$  Hz, H-6'), 4.66 (2H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-1'), 2.43 (3H, s, 6- $\text{CH}_3$ ), 2.11 (2H, m, H-4'), 2.11 (2H, m, H-5'), 1.78 (3H, s, 3'- $\text{CH}_3$ ), 1.67 (3H, s, H-9'), 1.61 (3H, s, H-8');  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta_{\text{C}}$  190.5 (C-9), 181.8 (C-10), 165.8 (C-3), 164.9 (C-1), 162.3 (C-8), 148.1 (C-6), 146.5 (C-10a), 142.6 (C-3'), 134.9 (C-4a), 131.8 (C-7'), 124.2 (C-6'), 123.4 (C-7), 121.0 (C-5), 117.8 (C-2'), 113.5 (C-8a), 109.9 (C-9a), 108.6 (C-4), 107.3 (C-2), 65.7 (C-1'), 39.5 (C-4'), 26.1 (C-5'), 25.5 (C-9), 22.3 (6- $\text{CH}_3$ ), 17.5 (3'- $\text{CH}_3$ ), 16.6 (C-8') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  ของสาร **GS10** กับสาร 3-Geranylemodin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **GS10** คือ 3-Geranylemodin [28]

### 3.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการนำสารทั้งหมด (GS1-GS10) ที่แยกได้โดยวิธีทางเทคนิคโครมาโทกราฟี มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ KB และ Hela S-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่าได้ผลตามตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (GS1-GS10) และสารมาตรฐาน Doxorubicin

สาร	ค่า IC <sub>50</sub> (μM)	
	KB	Hela S-3
GS1	45.05	69.22
GS2	>100	>100
GS3	5.23	7.95
GS4	4.69	7.57
GS5	5.07	5.81
GS6	4.30	6.60
GS7	38.17	65.26
GS8	1.46	1.62
GS9	>100	>100
GS10	>100	>100
Doxorubicin	0.13	0.03

จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB พบว่า สาร GS3, GS4, GS5, GS6 และ GS8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในระดับดี โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 5.23, 4.69, 5.07, 4.30 และ 1.46 ตามลำดับ ส่วนสาร GS1, GS2, GS7, GS9 และ GS10 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB โดยมีค่า IC<sub>50</sub> มากกว่า 30 μM

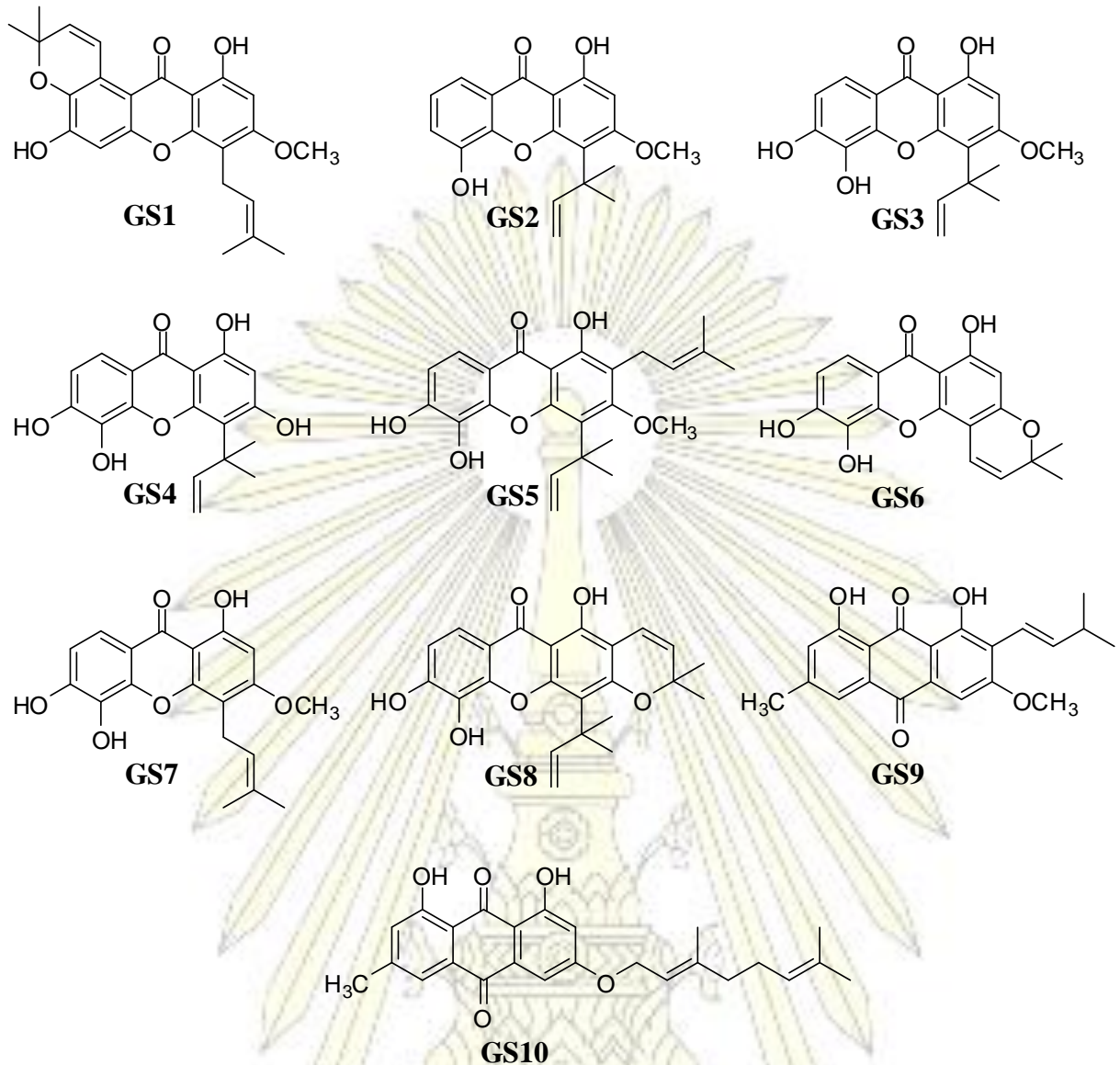
จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 พบว่า สาร GS3, GS4, GS5, GS6 และ GS8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ในระดับดี โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 7.95, 7.57, 5.81, 6.60 และ 1.62 ตามลำดับ ส่วนสาร GS1, GS2, GS7, GS9 และ GS10 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> มากกว่า 30 μM

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกมะดันมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า แยกได้สารใหม่ในกลุ่มแซนโทน (xanthenes) 2 ชนิด คือ Schomburgone A (GS1) และ Schomburgone B (GS2) นอกจากนี้พบสารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 8 ชนิด คือ Isocudranixanthone B (GS3), Gerontoxanthone I (GS4), Nigrolineaxanthone E (GS5), Isojacarecubin (GS6), Dulxanthone A (GS7), Macluraxanthone (GS8), Vismiaquinone (GS9) และ 3-Geranylemodin (GS10) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 พบว่าสาร GS3, GS4, GS5, GS6 และ GS8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 ในระดับดี โดยมีค่า  $IC_{50}$  ในช่วง  $1.46-7.95 \mu M$  ส่วนสาร GS1, GS2, GS7, GS9 และ GS10 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งชนิด KB และ Hela S-3 โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า  $30 \mu M$





รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ GS1-GS10

#### ข้อเสนอแนะ

1. ในสิ่งสกัดไคคลอโรรมีเทนมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการแยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเวลาจำกัด ดังนั้นควรแยกในส่วนนี้ต่อไป
2. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสิ่งสกัดไคคลอโรรมีเทนเพียงชนิดเดียว เพื่อการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และอาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดอื่นๆ เช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เป็นต้น
3. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกเท่านั้น อาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนอื่นอีกที่น่าสนใจ เช่น ราก ใบ และผล เป็นต้น
4. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจ

### เอกสารอ้างอิง

1. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *A cancer journal for clinicians* **2011**, *61*, 69–90.
2. Na, Y. Recent cancer drug development with xanthone structures. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2009**, *61*, 707-712.
3. Lim, T.K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. *Springer Science* **2012**, *2*, 1-6.
4. Kumar, P.; Baslas, R.K. Phytochemical and biological studies of plants of the genus *Garcinia*. *Herba Hung* **1980**, *19*, 81-91.
5. Lim, T.K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: *Springer Science* **2012**, *2*, 123-124.
6. medthai. [online] มะดัน.  
<https://medthai.com/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%94%E0%B8%B1%E0%B8%99/>  
(accessed 8 January 2018).
7. fruitipedia. [online] Madan.  
[http://www.fruitipedia.com/madan\\_garcinia\\_schomburgkiana.htm](http://www.fruitipedia.com/madan_garcinia_schomburgkiana.htm) (accessed 10 January 2018).
8. book.baanlaesuan. [online] มะดัน.  
<http://book.baanlaesuan.com/standard/schomburgkiana/> (accessed 10 January 2018).
9. puechkaset. [online] มะดัน.  
<http://puechkaset.com/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%94%E0%B8%B1%E0%B8%99/>  
(accessed 8 January 2018).
10. Häfner, A.; Frahm, A.W. Biflavonoids from the heartwood of *Garcinia schomburgkiana* and their structural elucidation as atropisomers. *Planta Medica* **1993**, *59*, A604.
11. Mungmee, C.; Sitthigool, S.; Buakeaw, A.; Suttisri, R. Xanthones and biphenyls from *Garcinia schomburgkiana* wood and their cytotoxicity *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *36*, 6-9.
12. Hau, T. Vo.; Ngoc-Tuyet, T.; Nguyen, Hieu T.; Nguyen, Khoa Q.; Do, Lien-Hoa, D.; Nguyen. Cytotoxic tetraoxygenated xanthones from the bark of *Garcinia schomburgkiana*. *Phytochemistry Letters* **2012**, *5*, 553-557.
13. Mungmee, C.; Sitthigool, S.; Buakeaw, A.; Suttisri, R. A new biphenyl and other constituents from the wood of *Garcinia schomburgkiana*. *Natural Product Research* **2013**, *27*(21), 1949-1955.

14. Ito, C.; Matsui, T.; Noda, E.; Ruangrunsi, N.; Itoigawa, M. Biphenyl derivatives from *Garcinia schomburgkiana* and the cytotoxicity of the isolated compounds. *Natural Product Communications* **2013**, *8*(9), 1265-1267.
15. Le.; Duy, H.; Nishimura, K.; Takenaka, Y.; Mizushima, Y.; Tanahashi, T. Polyprenylated Benzoylphloroglucinols with DNA Polymerase Inhibitory Activity from the Fruits of *Garcinia schomburgkiana*. *Journal of Natural Products* **2016**, *79*(7), 1798-1807.
16. Sukandar, E.R; Siripong, P.; Khumkratok, S.; Tip-pyang, S. New depsidones and xanthone from the roots of *Garcinia schomburgkiana*. *Fitoterapia* **2016**, *111*, 73-77.
17. Kongkathip, N.; Kongkathip, B.; Siripong, P.; Sangma, C.; Luangkamin, S.; Niyomdecha, M.; Pattanapa, S.; Piyaviriyagul, S.; Kongsaree, P. Potent antitumor activity of synthetic 1,2-Naphthoquinones and 1,4-Naphthoquinones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 3179-3191.
18. Klaikey, S.; Sukpondma, Y.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S. Friedolanostanes and xanthenes from the twigs of *Garcinia hombroniana*. *Phytochemistry* **2013**, *85*, 161-166.
19. Ishiguro, K.; Nakajima, M.; Fukumoto, H.; Isolt, K. Co-occurrence of prenylated xanthenes and their cyclization products in cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. *Phytochemistry* **1994**, *38*(4), 867-869.
20. Ito, C.; Miyamoto, Y.; Rao, K.S.; Furukawa, H. A novel dibenzofuran and two new xanthenes from *Calophyllum paniculatum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1996**, *44*, 441-3.
21. Kobayashi, M.; Mahmud, T.; Yoshioka, N.; Shibuya, H.; Kitagawa, I. Indonesian medicinal plants. XXI. Inhibitors of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger from the bark of *Erythrina variegata* and the roots of *Maclura cochinchinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1997**, *45*(10), 1615-9.
22. Chang, C.H.; Lin, C.C.; Hattori, M.; Namba, T. Prenylated xanthenes from *Cudrania cochinchinensis*. *Phytochemistry* **1989**, *28*(10), 2823-2826.
23. Rukachaisirikul, V.; Ritthiwigrom, T.; Pinsa, A.; Sawangchote, P.; Taylor, W.C. Xanthenes from the stem bark of *Garcinia nigrolineata*. *Phytochemistry* **2003**, *64*(6), 1149-56.
24. Ishiguro, K.; Nagata, S.; Fukumoto, H.; Yamaki, M.; Isoi, K.; Oyama, Y. An isopentenylated flavonol from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1583-1585.

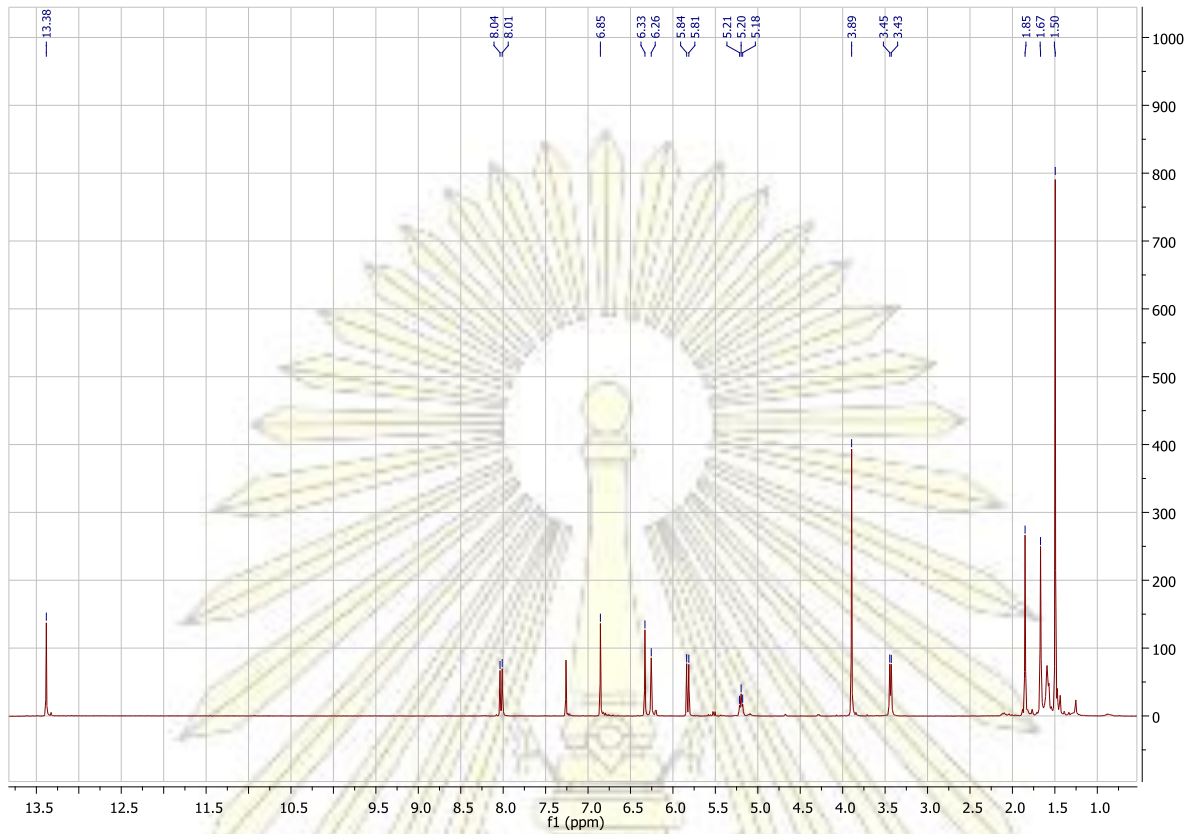
25. Ito, C.; Miyamoto, Y.; Nakayama, M.; Kawai, Y.; Rao, K.S.; Furukawa, H. A novel depsidone and some new xanthenes from *Garcinia* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1997**, *45*, 1403–1413.
26. Inuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Yonemori, S. Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 527-532.
27. M. L. S.; Goncalves.; Mors, W.B. Vismiaquinone, a  $\alpha$ -isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia Reichardtiana*. *Phytochemistry*, **1981**, *20*(8), 1947-1950.
28. Botta, B.; Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Marini Bettolo, G. B.; Oguakwa, J. U. 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxyanthraquinone and vismiones C, D, and E, from *Psorospermum febrifugum*. *Phytochemistry* **1983**, *22*(2), 539-42.



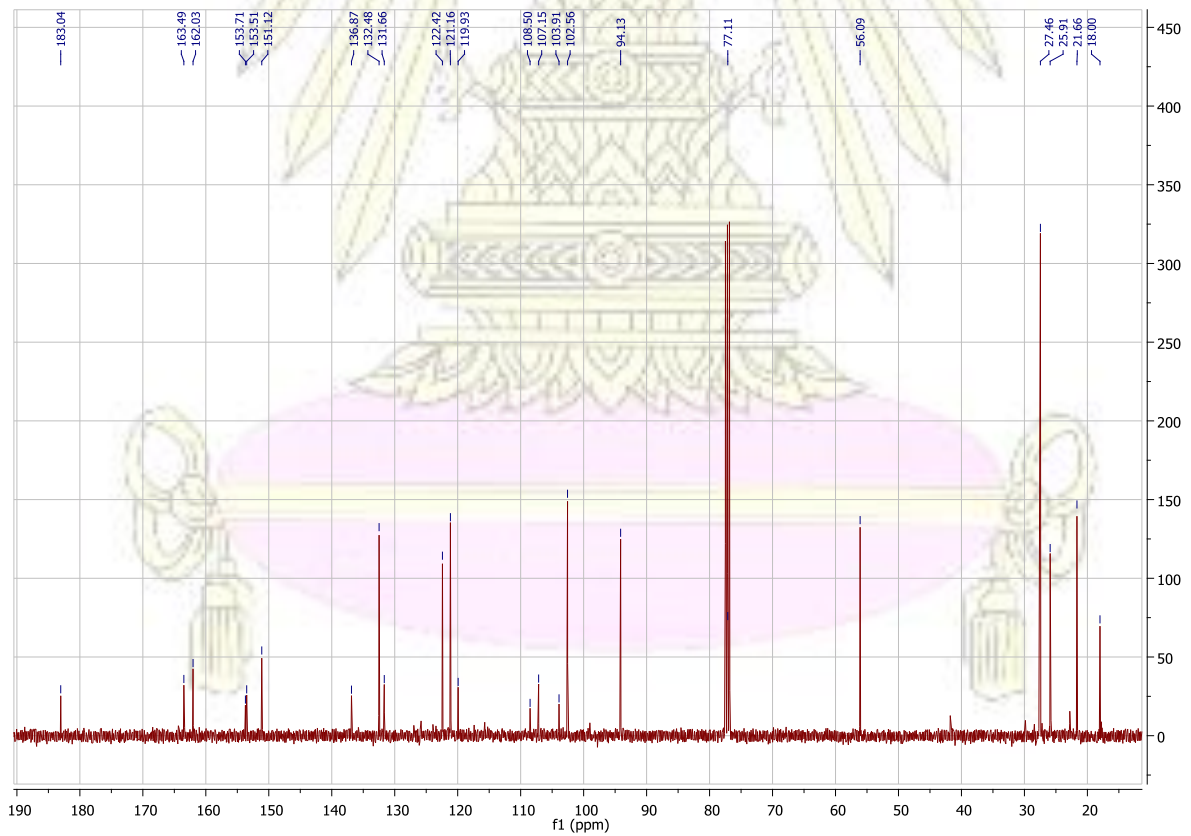


ภาคผนวก

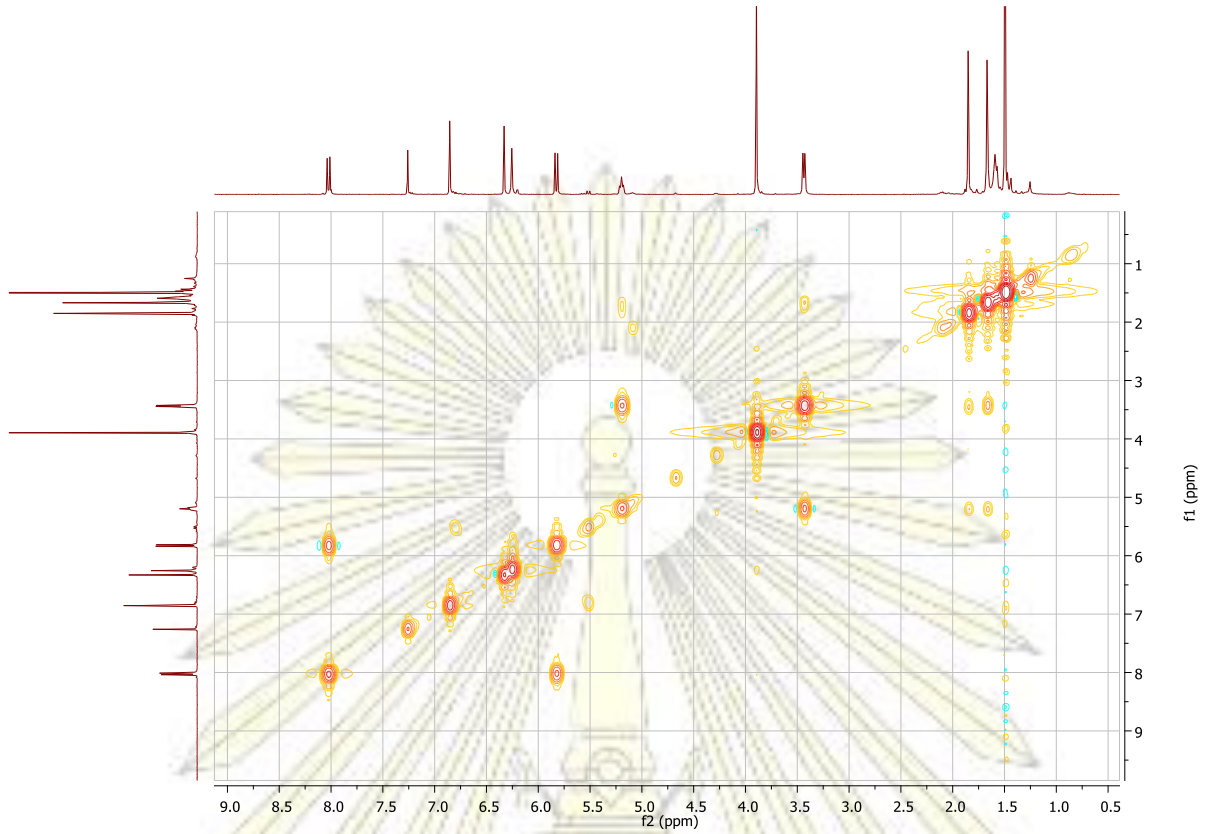




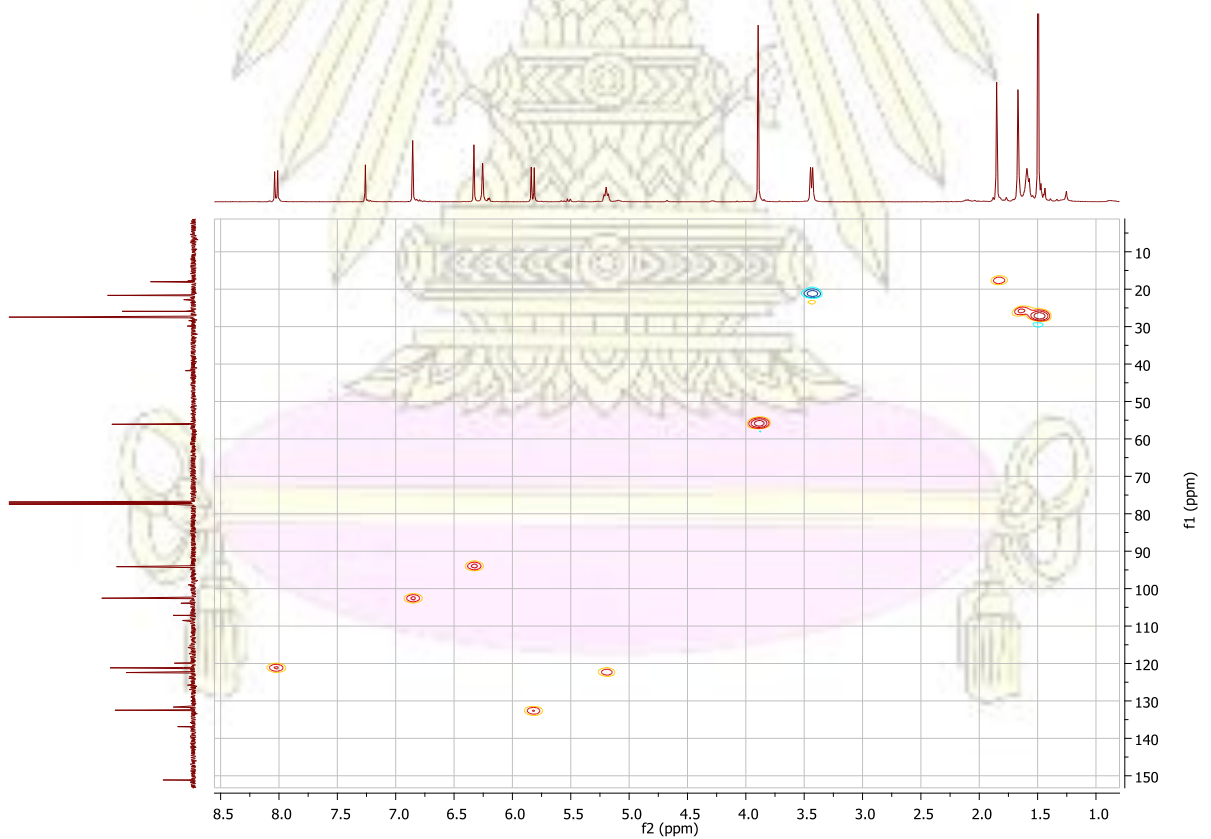
รูปที่ 1 สเปกตรัม <sup>1</sup>H-NMR ของ Schomburgone A (GS1) ใน CDCl<sub>3</sub>



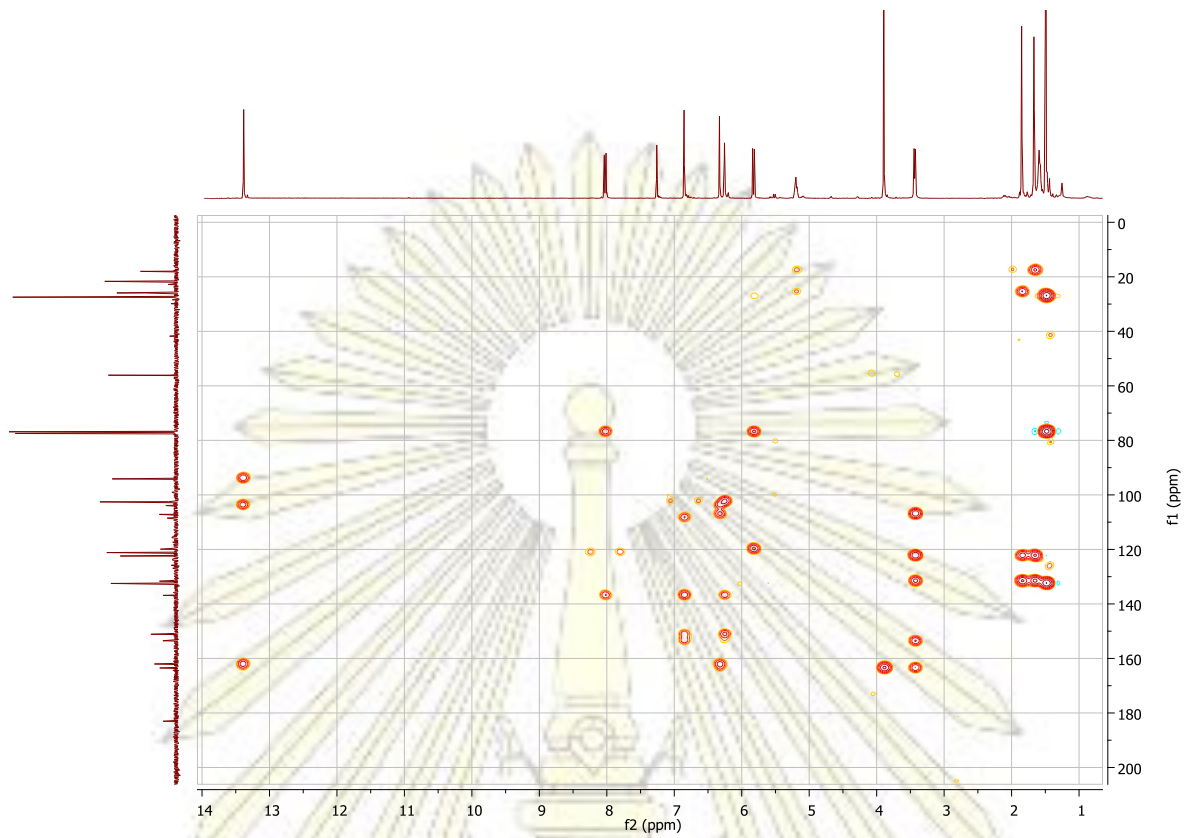
รูปที่ 2 สเปกตรัม <sup>13</sup>C-NMR ของ Schomburgone A (GS1) ใน CDCl<sub>3</sub>



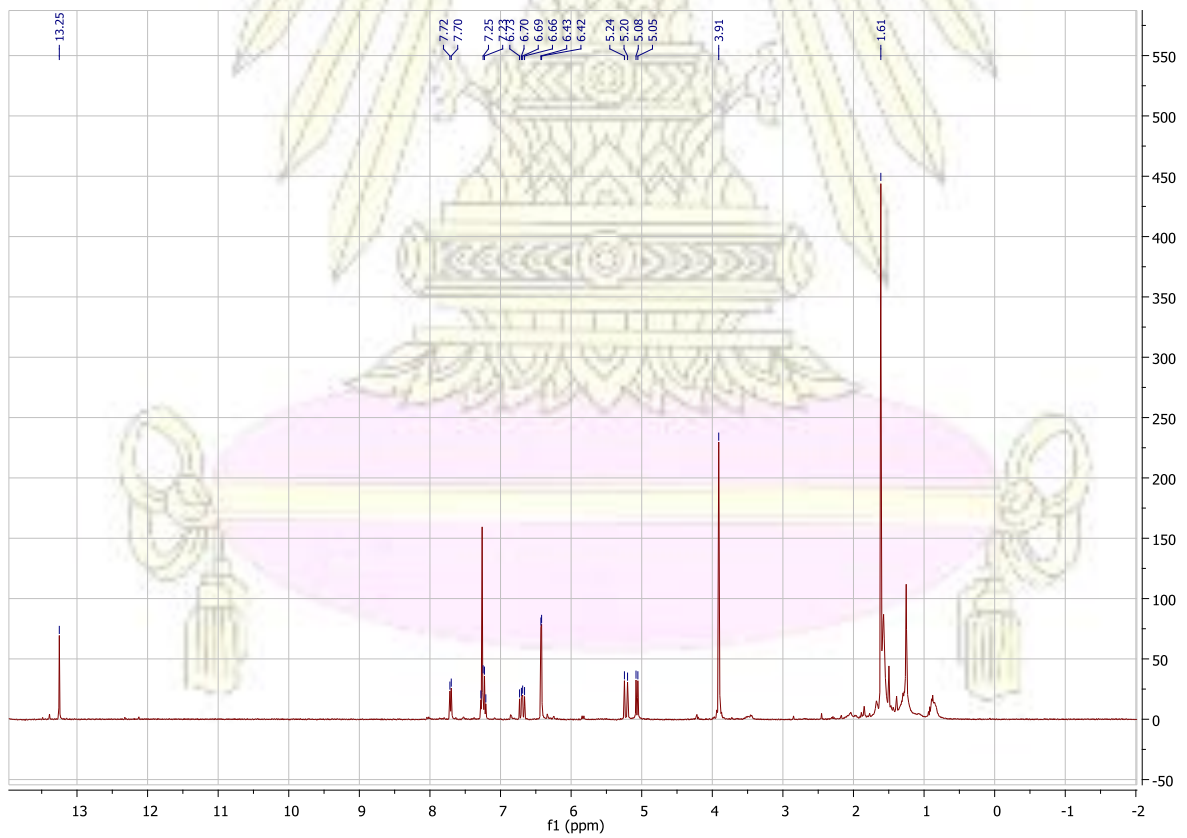
รูปที่ 3 สเปกตรัม COSY ของ Schomburgone A (GS1) ใน  $\text{CDCl}_3$



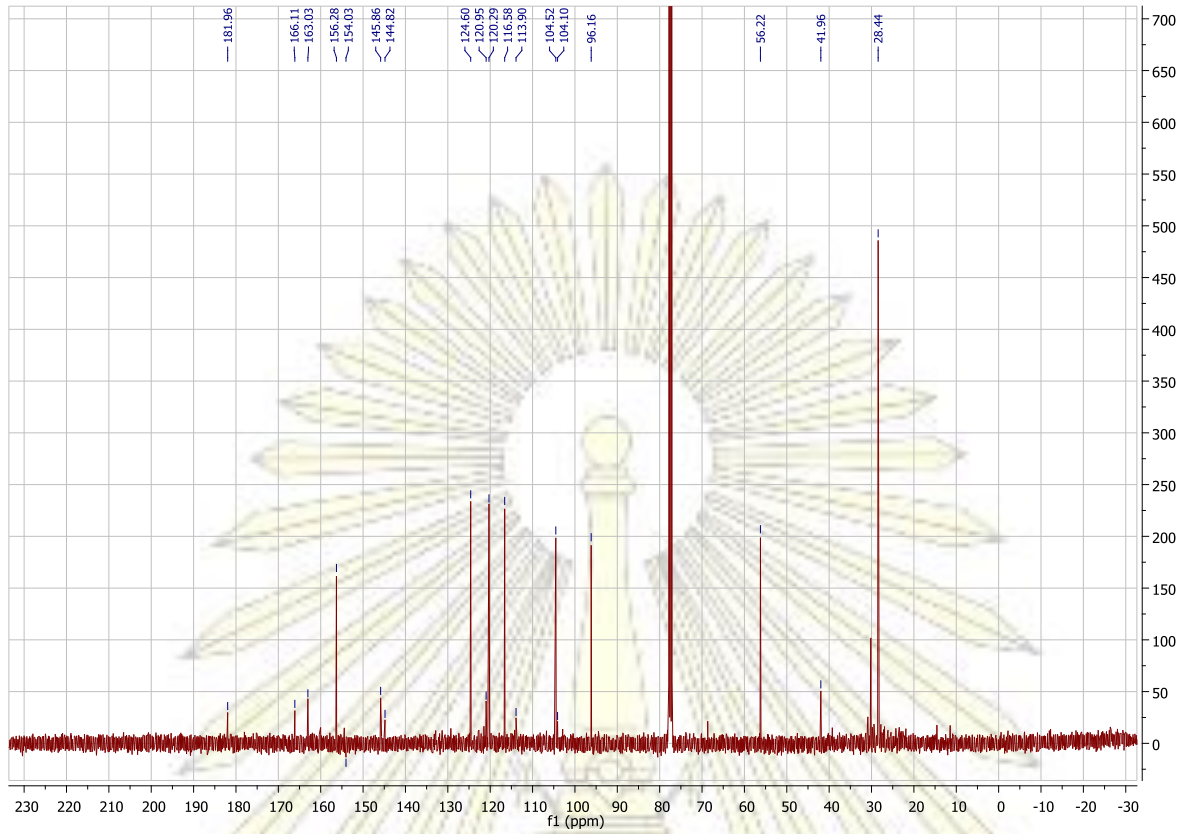
รูปที่ 4 สเปกตรัม HSQC ของ Schomburgone A (GS1) ใน  $\text{CDCl}_3$



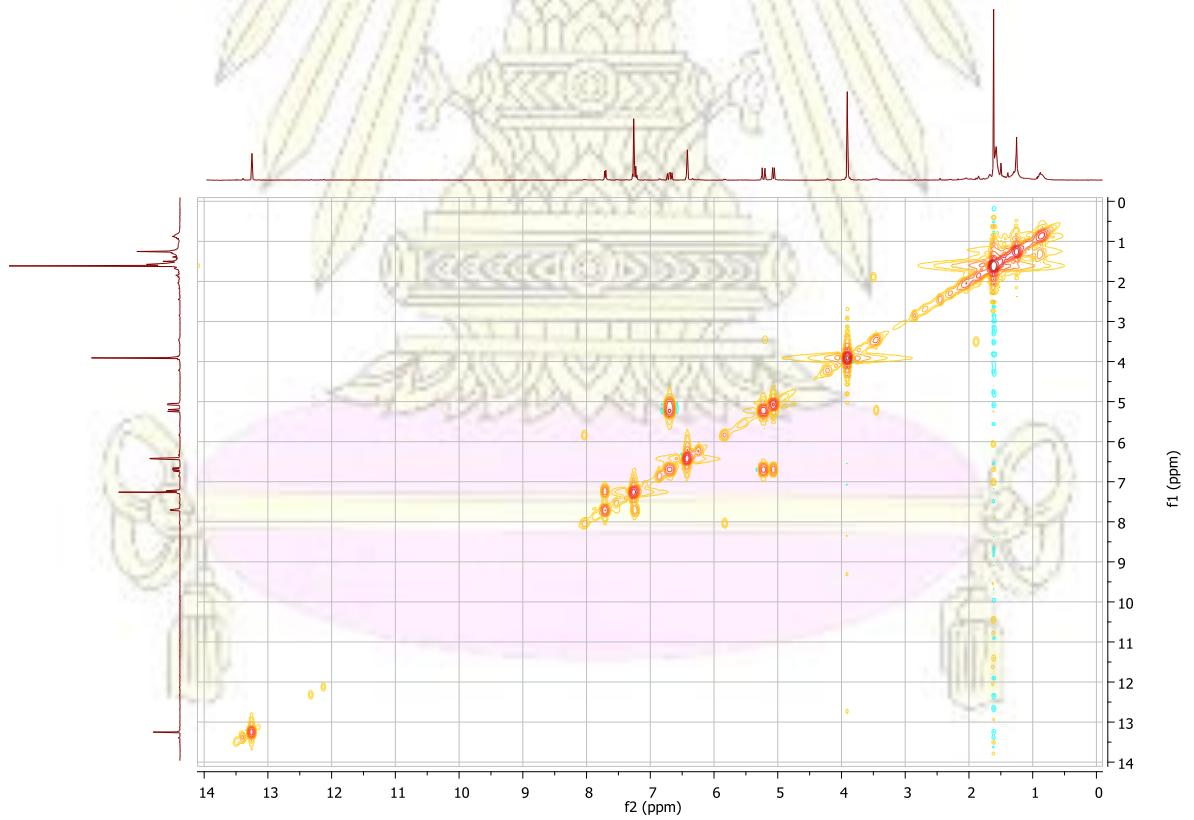
รูปที่ 5 สเปกตรัม HMBC ของ Schomburgone A (GS1) ใน  $\text{CDCl}_3$



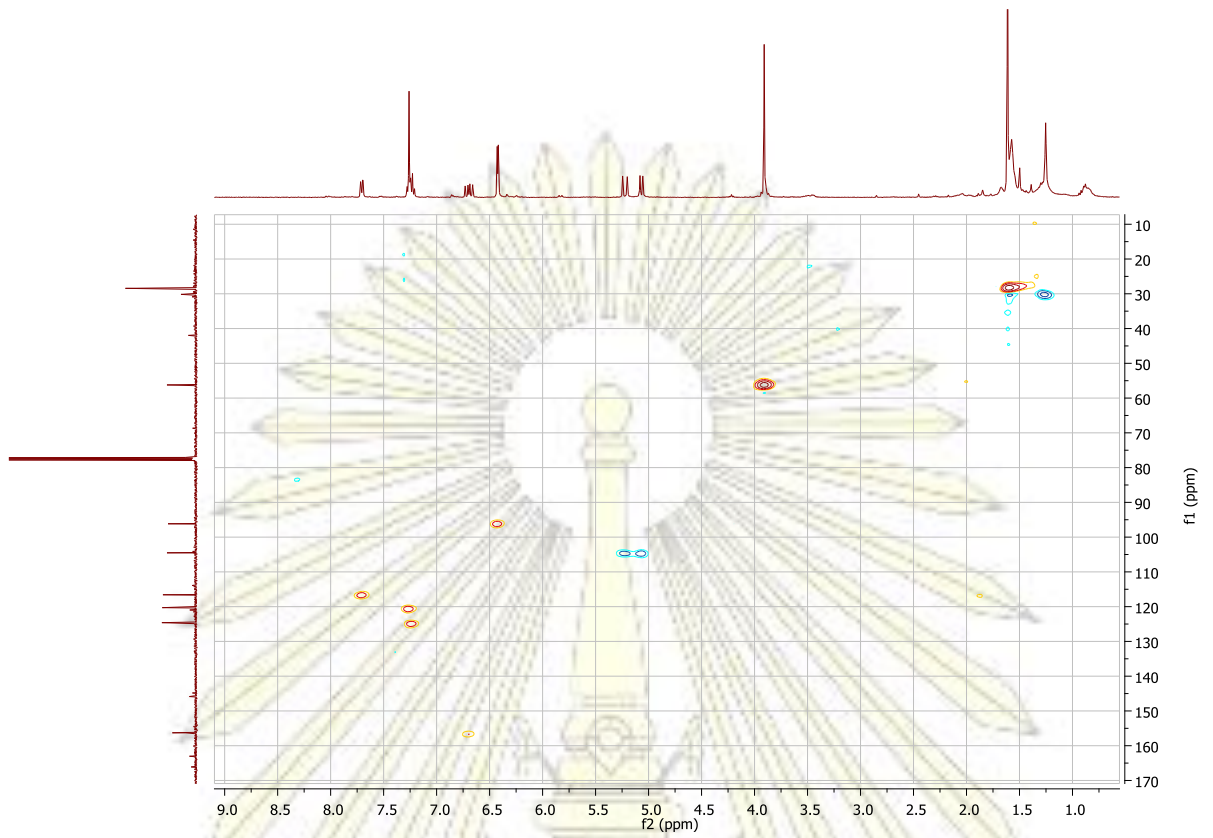
รูปที่ 6 สเปกตรัม  $^1\text{H-NMR}$  ของ Schomburgone B (GS2) ใน  $\text{CDCl}_3$



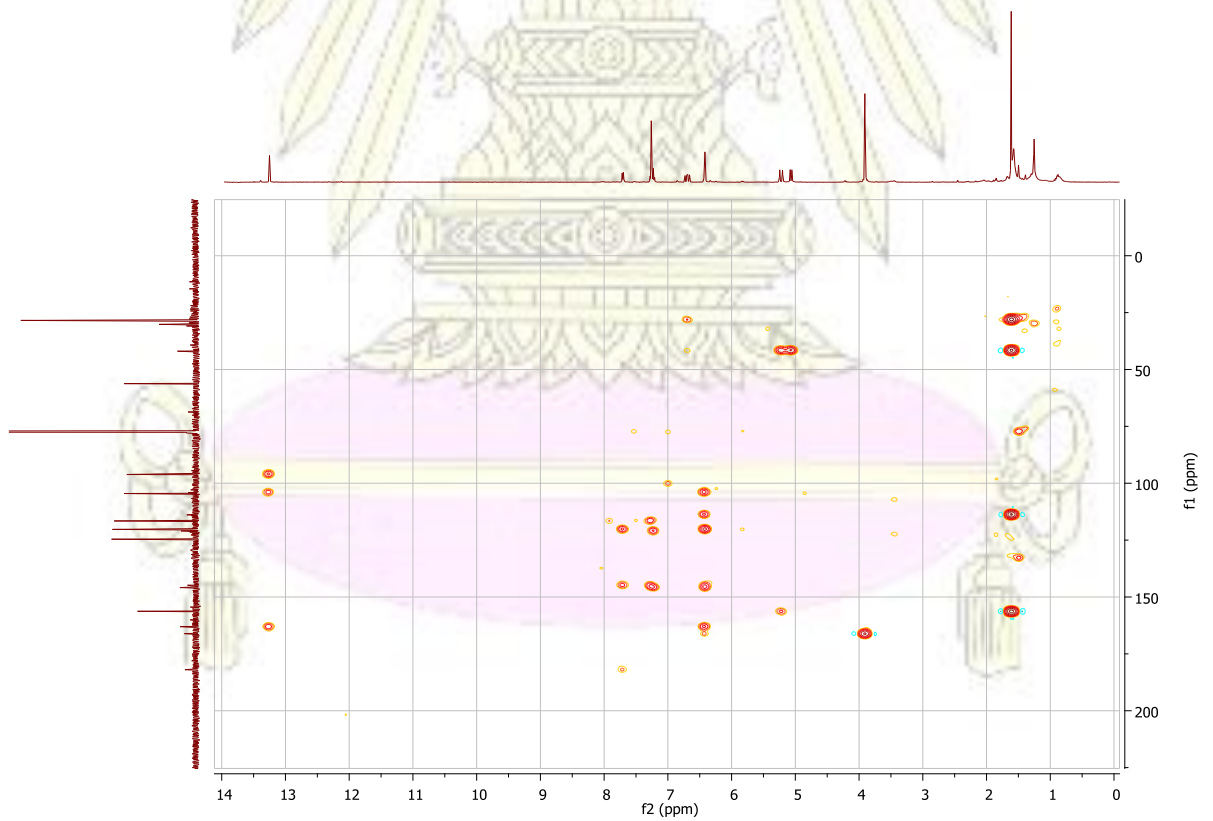
รูปที่ 7 สเปกตรัม  $^{13}\text{C-NMR}$  ของ Schomburgone B (GS2) ใน  $\text{CDCl}_3$



รูปที่ 8 สเปกตรัม COSY ของ Schomburgone B (GS2) ใน  $\text{CDCl}_3$



รูปที่ 9 สเปกตรัม HSQC ของ Schomburgone B (GS2) ใน CDCl<sub>3</sub>



รูปที่ 10 สเปกตรัม HMBC ของ Schomburgone B (GS2) ใน CDCl<sub>3</sub>

### ประวัติผู้วิจัย

นางสาวกมลวรรณ มัดสิงห์ เกิดเมื่อวันที่ 21 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสภาราชินี จังหวัดตรัง เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 65/1 หมู่ที่ 2 ตำบลลำภูรา อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง รหัสไปรษณีย์ 92190 อีเมล kamonwan-ms2@hotmail.com

