โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แซนโทนจากเปลือกรากของติ้วเกลี้ยงและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
Xanthones from the root bark of *Cratoxylum cochinchinense* and their cytotoxicity

ชื่อนิสิต นางสาวกิตติมา เอกฉันท์ เลขประจำตัว 5933002023

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แซนโทนจากเปลือกรากของติ้วเกลี้ยงและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Xanthones from the root bark of *Cratoxylum cochinchinense* and their cytotoxicity

โดย

นางสาวกิตติมา เอกฉันท์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ แซนโทนจากเปลือกรากของติ้วเกลี้ยงและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

โดย นางสาวกิตติมา เอกฉันท์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. รองศาสตราจารย์ ดร.โสมวดี ไชยอนันต์สุจริต ประธานกรรมการ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิน กรรมการ
3. รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์ อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 5 เดือน มิถุนายน พ.ศ.2563

ชื่อโครงการ แซนโทนจากเปลือกรากของติ้วเกลี้ยงและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวกิตติมา เอกฉันท์ เลขประจำตัว 5933002023
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกรากติ้วเกลี้ยงมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี พบว่าแยกได้สารใหม่ในกลุ่มแซนโทน (xanthone) 1 ชนิด คือ cratochinone B (**CC-01**) นอกจากนี้พบสารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 3 ชนิด คือ macluraxanthone (**CC-02**), β-mangostin (**CC-03**) และ pancixanthone A (**CC-04**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ Hep G2 พบว่าสาร **CC-01** และ **CC-02** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ Hep G2 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 0.91-9.57 μM

คำสำคัญ: ติ้วเกลี้ยง, แซนโทน, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Project Title Xanthones from the root bark of *Cratoxylum cochinchinense* and their cytotoxicity

Student Name Miss Kittima Ekachan Student ID 5933002023

Advisor Name Associate Professor Santi Tip-pyang, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

A new xanthone, named cratochinone B (**CC-01**), along with three known xanthones, macluraxanthone (**CC-02**), *β*-mangostin (**CC-03**) and pancixanthone A (**CC-04**), were isolated from the root bark of *Cratoxylum cochinchinense.* Their structures were determined by spectroscopic analysis as well as comparison with the previously published data. All isolated compounds were evaluated for their cytotoxicity against KB, HeLa S-3 and Hep G2 cell lines. Compounds **CC-01** and **CC-02** showed good cytotoxicity against KB, Hela S-3 and HepG2 cell with IC_{50} values in the range of 0.91-9.57 µM.

Keywords: *Cratoxylum cochinchinense*, xanthones, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ทิพยางค์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาสละเวลา ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.โสมวดี ไชยอนันต์สุจริต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิน ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยตระหนักถึง ความตั้งใจและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณพี่ร่วมแล็บภาควิชาเคมี ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา แนะแนวทาง เทคนิคการวิจัย เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดจนการปรับปรุงและตรวจสอบรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนบางส่วนในการทำวิจัย รวมทั้งรุ่นพี่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรทางการศึกษา และผู้สนใจทั่วไปไม่มากก็น้อย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญแผนภาพ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นติ้วเกลี้ยง	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	7
2.1 พืชตัวอย่าง	7
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	7
2.3 สารเคมี	8
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	8
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	9
2.5.1 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	9
2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)	10
2.5.3 Sephadex LH-20 (Column Chromatography)	10
2.5.4 Radical chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron®)	11
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	12
2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	12
2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ	12
2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	13
2.7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้	16
3.1.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CC-01**	16
3.1.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CC-02**	19
3.1.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CC-03**	19
3.1.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **CC-04**	20
3.1.9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	20
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	22
ข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	26
ประวัติผู้วิจัย	30

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR (400 MHz) และ^{13}C-NMR (100 MHz) ของสาร **CC-01**	17
ตารางที่ 3.2	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**CC-01 – CC-04**) และสารมาตรฐาน Doxorubicin	20

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 ลักษณะของดอกและใบของต้นติ้วเกลี้ยง 2
รูปที่ 1.2 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกรากของติ้วเกลี้ยง 3
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วเกลี้ยง 3
รูปที่ 1.4 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วเกลี้ยง 4
รูปที่ 1.5 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วเกลี้ยง 4
รูปที่ 1.6 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเนื้อไม้ของติ้วเกลี้ยง 5
รูปที่ 1.7 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลำต้นของติ้วเกลี้ยง 5
รูปที่ 1.8 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งและก้านของติ้วเกลี้ยง 6
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสาร **CC-01** 16
รูปที่ 3.2 ข้อมูล HMBC (ลูกศรหัวเดียว) และ COSY (เส้นทึบ) ของโครงสร้าง **CC-01** 17
รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสาร **CC-02** 19
รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร **CC-03** 19
รูปที่ 3.5 โครงสร้างของสาร **CC-04** 20
รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารที่แยกได้ **CC-01 – CC-04** 22

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกรากติ้วเกลี้ยง 15

สารบัญภาคผนวก

หน้า

รูปที่ 1 สเปกตรัม HRESIMS ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$ 27
รูปที่ 2 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$ 27
รูปที่ 3 สเปกตรัม ^{13}C-NMR ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$ 28
รูปที่ 4 สเปกตรัม HSQC ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$ 28
รูปที่ 5 สเปกตรัม HMBC ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$ 29

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

UV	ultraviolet
NMR	nuclear magnetic resonance
TLC	thin layer chromatography
IC_{50}	the half maximal inhibitory concentration
µg/ml	microgram per milliliter
µM	micromolar
µL	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
δ_H	chemical shift of proton (NMR)
δ_C	chemical shift of carbon (NMR)
$CDCl_3$	deuterated chloroform
^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
^{13}C-NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	correlation spectroscopy
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation

บทที่ 1
บทนำ

มะเร็งเป็นกลุ่มอาการผิดปกติที่เกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น ปัจจัยทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ซึ่งทำให้เกิดการเจริญเติบโตผิดปกติของเซลล์ภายในร่างกาย โดยมะเร็งที่พบส่วนใหญ่ คือ มะเร็งเต้านม มะเร็งในกระเพาะอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งตับ เป็นต้น โรคมะเร็งนั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก จึงมีผู้วิจัยได้ค้นคว้าหายารักษาโรคมะเร็ง โดยยารักษาโรคมะเร็งนั้นมีทั้งสารที่ได้จากการสังเคราะห์ และสารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อนำมารักษาโรคมะเร็งนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องสารสกัดจากธรรมชาตินั้นให้ผลกระทบข้างเคียงต่อร่างกายน้อยกว่าการใช้สารสังเคราะห์ จึงทำให้มีการค้นหายารักษาโรคมะเร็งจากวัสดุธรรมชาติ เช่น ต้นไม้ จากการศึกษาพฤกษาพื้นบ้านพบว่ามีการนำส่วนต่าง ๆ ของต้นไม้มาใช้เป็นยารักษาโรคหรืออาการผิดปกติของร่างกาย เช่น อาการไอ ไข้หวัด อาการปวดหัว ท้องเสีย และท้องผูก เป็นต้น จากการศึกษาพฤกษของพืชสกุลนี้มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารในกลุ่ม xanthones, anthraquinones, triterpenoids, และ tocotrienols ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ ต้านมะเร็ง (anticancer) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial)[1] และต้านเชื้อ HIV (anti-HIV)[2] สำหรับพืชในสกุลนี้นำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น รักษาโรคโลหิต อาการเสียดท้องหรืออาการที่เกี่ยวข้องกับลำไส้ และมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อน ๆ เป็นต้น

จากงานวิจัยที่ผ่านมามีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และมักมีการรายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ นอกจากนี้รายงานวิจัยเกี่ยวข้องกับเปลือกรากติ้วเกลี้ยงยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะค้นคว้าและวิจัยองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดที่แยกได้จากเปลือกรากติ้วเกลี้ยง เพื่อนำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นติ้วเกลี้ยง

ติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ *Hypericaceae* สกุล *Cratoxylum* มีลักษณะทั่วไปเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้น พบได้ทั่วไปในประเทศพม่า จีน ลาว กัมพูชา ลาว เวียดนาม และทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย[3] ไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงใหญ่ ผลัดใบ เปลือกเรียบ หรือแตกเป็นสะเก็ด สีเทาอมน้ำตาล เปลือกต้นด้านในสีเหลืองอ่อน ลำต้นเปลาตรง มีน้ำยางสีเหลืองแกมแดง มีหนามแหลมยาว แข็งเป็นเนื้อไม้ ออกตามลำต้น ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปไข่

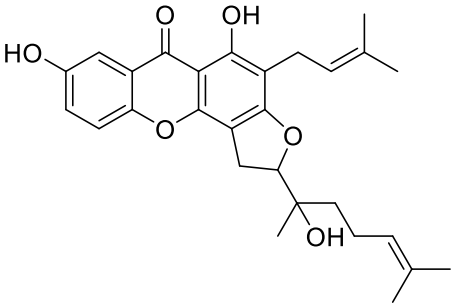
กลับ ปลายแหลม พบบ้างที่ปลายใบทู่หรือกลม โคนสอบหรือมน ขอบใบเรียบ แผ่นใบบางคล้ายกระดาษถึงกึ่งหนาคล้ายแผ่นหนัง เกลี้ยงทั้งสองด้าน ด้านล่างมักมีนวล เส้นแขนงใบข้างละ 10 – 18 เส้น ปลายเชื่อมกันก่อนถึงขอบใบ ดอก เป็นดอกเดี่ยว หรือออกเป็นกระจุก 2 – 5 ดอก ที่ซอกใบหรือปลายกิ่งเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ใบประดับขนาดเล็ก ร่วงง่าย ดอกมีกลิ่นหอม ก้านดอกยาว ประมาณ 1 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 5 กลีบ แยกเป็น 2 วง วงนอก 3 กลีบ ตรงกลางกลีบสีม่วงแดง ขอบสีเขียว ขนาดกลีบใหญ่กว่าวงในเล็กน้อย กลีบวงในมี 2 กลีบ สีเขียว รูปไข่ หรือรูปไข่กลับ กลีบดอก 5 กลีบ แยกออกจากกัน สีส้มหรือส้มแดง รูปไข่กลับ ผิวกลีบเกลี้ยง มีเส้นสีม่วงแดงถึงดำตามยาว เกสรเพศผู้จำนวนมาก เชื่อมติดกันเป็น 3 กลุ่ม สลับกับกลุ่มเกสรเพศผู้ที่ไม่สมบูรณ์ 3 อัน ลักษณะเป็นก้อน อวบน้ำ สีเหลือง รังไข่อยู่เหนือวงกลีบเกลี้ยง มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีออวุลจำนวนมาก ก้านเกสรเพศเมีย 3 อัน แยกออกจากกัน ผลมีลักษณะเป็นรูปวงรี แข็ง เกลี้ยงเป็นมัน กลีบเลี้ยงติดทน หุ้ม 2 ใน 3 ของความยาวผล ผลแก่แตกตามรอยประสาน เป็น 3 พู เมล็ด 6 – 8 เมล็ดต่อช่อง เมล็ดมีปีกแบนและบางใส พบได้ใน ป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ความสูงตั้งแต่ใกล้ระดับ จนถึงประมาณ 700 เมตร ออกดอกและเป็นผล ระหว่างเดือนมกราคมถึงสิงหาคม[4]

รูปที่ 1.1 ลักษณะดอกและใบของต้นติ้วเกลี้ยง

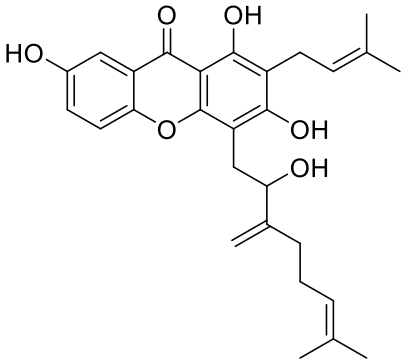
1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษางานวิจัยของต้นติ้วเกลี้ยงที่รายงานมาก่อนหน้า พบว่าองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นสารในกลุ่ม xanthones, anthraquinones, triterpenoids, และ tocotrienols และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

Peng และคณะ[5] (2018) แยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอลจากเปลือกรากต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 12 ชนิด ประกอบด้วยสารใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ cratoxanthone E และ cratoxanthone F พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 10 ชนิด ซึ่งสารชนิดใหม่ทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนไทโรซีนฟอสฟาเทส 1บี (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) และ α-glucosidase



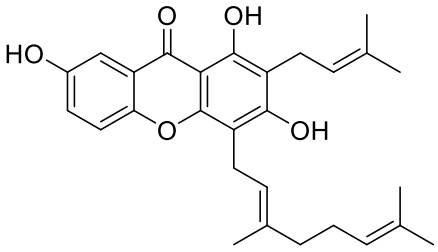
cratoxanthone E



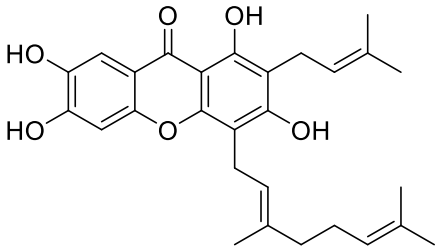
cratoxanthone F

รูปที่ 1.2 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกรากของติ้วเกลี้ยง

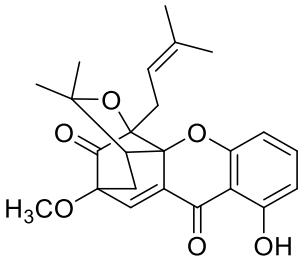
Mahabusarakum และคณะ[6] (2006) แยกสารจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 11 ชนิด ประกอบด้วยสารใหม่ 4 ชนิด ได้แก่ cochinchinone A, B, C, และ D พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 7 ชนิด ซึ่งสาร cochinchinone B มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี



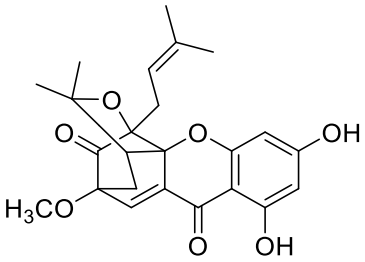
cochinchinone A



cochinchinone B



cochinchinone C

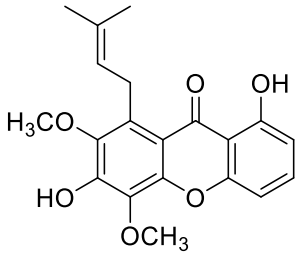


cochinchinone D

รูปที่ 1.3 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วเกลี้ยง

Laphookhieo และคณะ[7] (2006) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน และไดคลอโรมีเทนจากรากต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 7 ชนิด ประกอบด้วยสารใหม่ 1 ชนิด ได้แก่ 5-*O*-methylcelebixanthone พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 6 ชนิด คือ celebixanthone, 1,3,7-trihydroxy-2,4-di(3-methylbut-2-enyl)xanthone, cochinchinone A, α-mangostin, β-mangostin และ cochinchinone C ซึ่งสารที่เคยรายงานมาแล้ว 5 ชนิด มีฤทธิ์ต่อต้าน

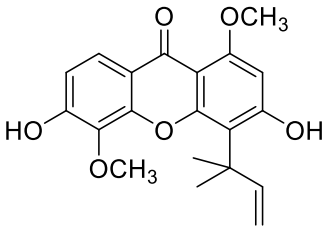
เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ยกเว้นสาร 1,3,7-trihydroxy-2,4-di(3-methylbut-2-enyl)xanthone และสารชนิดใหม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum*



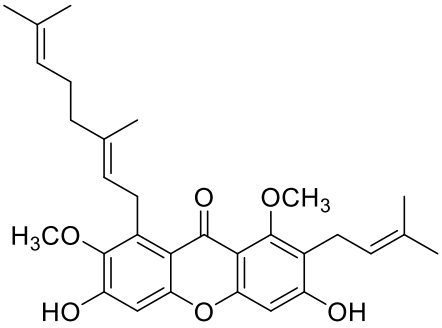
5-*O*-methylcelebixanthone

รูปที่ 1.4 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วเกลี้ยง

Natrsanga และคณะ[8] (2019) แยกสารจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 18 ชนิด ประกอบด้วยสารใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ cratochinone A และ cratochinone B พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 16 ชนิด ซึ่งสาร cratochinone B, macluraxanthone, และ pruniflorone G มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB, HeLa S-3, HT-29, MCF-7 และ Hep G2 cell lines สาร 9-hydroxycalabaxanthone มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB, HeLa S-3, และ HT-29 cells และสาร formoxanthone B มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ HeLa S-3 cells



cratochinone A

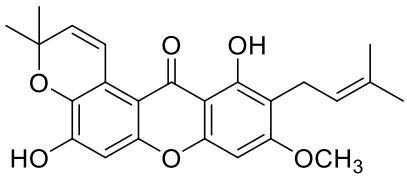


cratochinone B

รูปที่ 1.5 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของติ้วเกลี้ยง

Phuwapraisirisan และคณะ[9] (2006) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, และเมทานอลจากเนื้อไม้ต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 6 ชนิด ประกอบด้วยสารชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ cratoxylumxanthone A พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 5 ชนิด คือ dulcisxanthone B, α-mangostin, β-mangostin, 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3-methylbut-2-enyl)xanthone และ tectochrystin โดยสาร dulcisxanthone B และ2-geranyl-

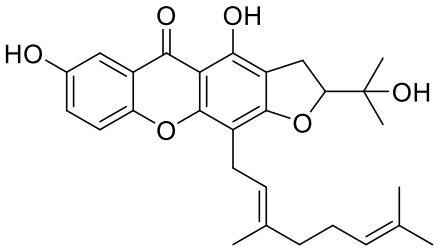
1,3,7-trihydroxy-4-(3-methylbut-2-enyl)xanthone มีฤทธิ์ยับยั้งต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation



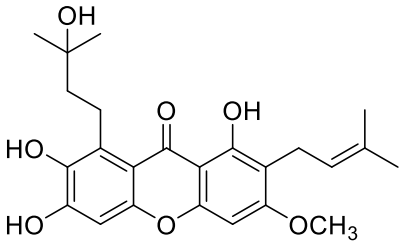
cratoxylumxanthone A

รูปที่ 1.6 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเนื้อไม้ติ้วเกลี้ยง

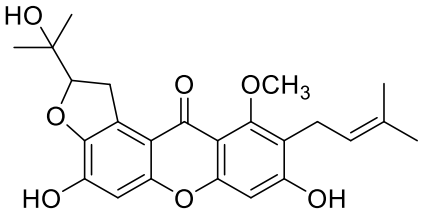
Udomchotphruet และคณะ[10] (2012) แยกสารจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากลำต้นต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 8 ชนิด ประกอบด้วยสารชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ cratoxylumxanthones B, C, และD มีฤทธิ์ยับยั้งต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation



cratoxylumxanthones B



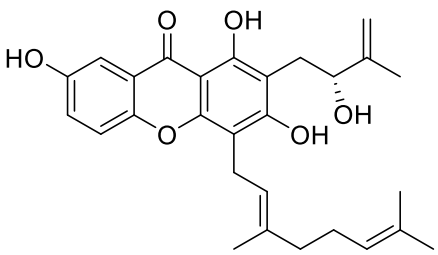
cratoxylumxanthones C



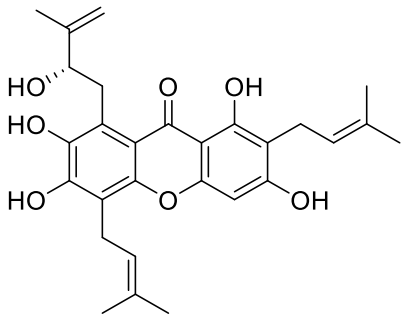
cratoxylumxanthones D

รูปที่ 1.7 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่ได้จากลำต้นติ้วเกลี้ยง

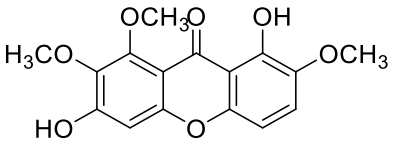
Ito และคณะ[11] (2017) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตจากกิ่งและก้านต้นติ้วเกลี้ยงพบสารในกลุ่ม xanthones ทั้งหมด 10 ชนิด ประกอบด้วยสารชนิดใหม่ 4 ชนิด คือ cratoxanthone A, B, C, และ D พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 6 ชนิด ซึ่งสาร cratoxanthone A และ B มีฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ NALM-6(B cell line of acute lymphoid leukemia)



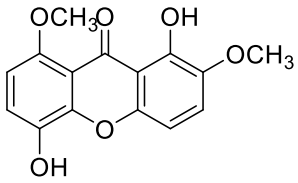
cratoxanthone A



cratoxanthone B



cratoxanthone C



cratoxanthone D

รูปที่ 1.8 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งและก้านติ้วเกลี้ยง

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกรากติ้วเกลี้ยงให้บริสุทธิ์
2. พิสูจน์ทราบเอกลักษณ์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB, Hela S-3 และ Hep G2 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

รากติ้วเกลี้ยงที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากจังหวัดลำปาง เดือนเมษายน 2561

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ (column)
2. บีกเกอร์ (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. กระบอกตวง (cylinder)
12. ไฮโดรมิเตอร์ (hydrometer)
13. กระดาษกรอง (filter paper)
14. หลอดคะปิลลารี (capillary tube)
15. ไมโครปิเปต (micropipette)
16. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
17. เครื่อง hot plate stirrer
18. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
19. เครื่อง mass spectrometer รุ่น Trio 2000
20. เครื่อง nuclear magnetic resonance (NMR) Spectrometer (Bruker®. 400 MHz)
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) ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) เอทิลอะซิเตท (EtOAc) เมทานอล (MeOH) อะซิโตน (acetone) คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) คลอโรฟอร์มดี ($CDCl_3$) และอะซิโตน-ดิวเทอเรียม (acetone-*d*6)
2. ซิลิกาเจลเบอร์ 7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography)
4. Sephadex LH-20
5. Anisaldehyde reagent
6. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จัดหารากของติ้วเกลี้ยง อุปกรณ์ และสารเคมี
2. นำรากติ้วเกลี้ยงมาสับและตากให้แห้ง บดให้มีขนาดเล็กลง สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดด้วย thin layer chromatography (TLC)
4. แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น silica gel, sephadex LH-20 column chromatography และ radical chromatograph chromatotron เป็นต้น พร้อมศึกษาหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยแผ่น TLC หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ทำการแยกซ้ำโดยการเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่
5. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโทรเมตรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้วในฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ต
6. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ HepG2
7. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)[12]

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets Silica gel 60 F254 ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการกำหนดระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต้มสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคะปิลลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรอง และมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุด (solvent front) ที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารโดยส่องด้วย UV Lamp ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในสารละลาย anisaldehyde/H_2SO_4 แล้วปิ้งบน hot plate อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

ก. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาด และมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การแต้มสาร นำแผ่น TLC มาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปด้านบน และขีดกำหนดระดับด้านล่างตรงตำแหน่งที่ต้องการแต้มสารจากนั้นใช้หลอด คะปิลลารีจุ่มลงไปในสารละลายที่ต้องการทดสอบ แล้วแต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นที่ใช้ ดินสอขีดไว้ ให้เป็นจุดวงกลมเล็ก ๆ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตร และแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร หลังจากที่จุดสารที่แต้มแห้งสนิทแล้วจึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้ว ทั้งนี้ระดับของจุดสารบน TLC ควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อยจากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อย ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ใช้ดินสอขีดไว้แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร

- นำแผ่น TLC ไปส่องกับแสง UV เพื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสง UV ของสาร
- ในกรณีที่สารไม่สามารถดูดกลืนแสง UV ให้นำแผ่น TLC ไปจุ่มลงใน anisaldehyde หรือ ใน conc. H_2SO_4 แล้วเป่าด้วยลมร้อนให้แห้งตำแหน่งที่มีสารจะปรากฏให้เห็น

2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)[13]

ตัวดูดซับ (stationary phase) คือ ซิลิกาเจล ชนิด 60G Art. 7734

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่แยกประมาณ 20 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก กล่าวคือ ในตอนแรกต้อง เขย่าของผสมระหว่างซิลิกาเจลกับตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการ และระดับซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกา เจล แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดควรระเหยตัวทำละลายให้เกือบแห้งแล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจลเบอร์ 7734 โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไป บดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ให้นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้งก่อนใส่คอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ เติมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลายด้านบนใส จากนั้น จึงเริ่มเปลี่ยนตัวทำละลายชนิดใหม่ต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.3 Sephadex LH-20 (Column Chromatography)[13]

เป็นเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเหลว ซึ่งเป็นการแยกสารให้บริสุทธิ์ตามขนาดของ โมเลกุล ส่วนใหญ่ใช้ในการแยกของสารกลุ่ม steroids, terpenoids และ lipids เป็นต้น ตัวดูดซับ (stationary phase) คือ sephadex LH-20 ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก ใช้ตัวทำละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล คนตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อย ๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดตรงปลาย และมีตัวทำละลาย อยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เท sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ เพื่อให้ sephadex LH-20 อัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้ จนกระทั่งบรรจุ sephadex LH-20 ในระดับที่ต้องการ และระดับ sephadex LH-20 ไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับ sephadex LH-20 แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยละลายสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นใช้หลอดหยดดูดสารละลายที่ต้องการแยก แล้วบรรจุลงไปในคอลัมน์ และ

เปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลายด้านบนใส จากนั้นจึงเติมสารละลาย 1:1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.4 Radial chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron®)[14]

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ซึ่งจะมีหลักการ ทำงานคือ นำสารละลายของสารที่ต้องการแยกหยดลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร ไขตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในกรวยแยก แล้วจึงเปิดเครื่องโดย แผ่นแก้วทรงกลมจะเกิดการหมุน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่น พร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสาร ขึ้น ซึ่งจะมองเห็นได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมขณะทำการแยก แล้วทำการ เก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้ ดังนั้นข้อดีสำหรับเทคนิคนี้คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี กล่าวคือใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เนื่องจากแรงจากการหมุนเหวี่ยงจะช่วยทำให้ เกิดการแยกได้ดีและเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารที่แยกได้ทันที โดยใช้ UV Lamp ทำให้ง่ายต่อการเก็บแฟรกชัน

ก. การเตรียมวัฏภาคนิ่ง ชั่งซิลิกาเจล หนัก 30 กรัม ผสมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวจากนั้นนำไปเคลือบด้านบนแผ่นแก้วทรงกลม

ข. รอให้แผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลแห้งแล้วมาปรับความหนาของซิลิกาให้มีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร

ค. เปิดเครื่องโครมาโททรอนแล้วหยดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ขณะกำลังหมุน

ง. ปล่อยตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในเครื่องโครมาโททรอน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่น พร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นแถบสารที่แยกได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบน แผ่นแก้วทรงกลมและทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำรากติ้วเกลี้ยงมาสับและตากให้แห้ง บดให้มีขนาดเล็กลง สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล

2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ

1. นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

2. นำสิ่งที่สกัดได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลายผสม 0% ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนจนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 7 แฟรกชั่น (1-7)

3. นำสารแต่ละแฟรกชัน (1-7) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

4. นำสารสกัดแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

5. นำแฟรกชัน 1 ที่ผ่านการแยก นำมาแยกด้วยเทคนิค Silica gel column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 3 แฟรกชัน (1.1-1.3) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พบว่าแฟรกชัน 1.3 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำแฟรกชัน 1.3 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโตตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CC-01**

7. นำแฟรกชัน 2 ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารละลายจากแฟรกชันนี้ได้ 5 แฟรกชัน (2.1-2.5) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พบว่าแฟรกชัน 2.1 และ 2.5 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

8. นำแฟรกชัน 2.1 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโตตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความ

บริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CC-02**

9. นำแฟรกชัน 2.5 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโตตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CC-03**

10. นำแฟรกชัน 3 ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Sephadex LH-20 column chromatography ด้วยตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล โดยเก็บสารจากแฟรกชันนี้ได้ทั้งหมด 6 แฟรกชัน (3.1-3.6) นำแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่เหมาะเป็นวัฏจักรเคลื่อนที่พบว่าแฟรกชัน 3.1 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

11. นำแฟรกชัน 3.1 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโตตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 20% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **CC-04**

2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method[15]

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด KB, HeLa S-3 และ Hep G2 ให้ได้ความเข้มข้น $3x10^3$ เซลล์ ใน 200 µL ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งมี 5% ปริมาตรต่อปริมาตร fetal calf serum เป็นองค์ประกอบ

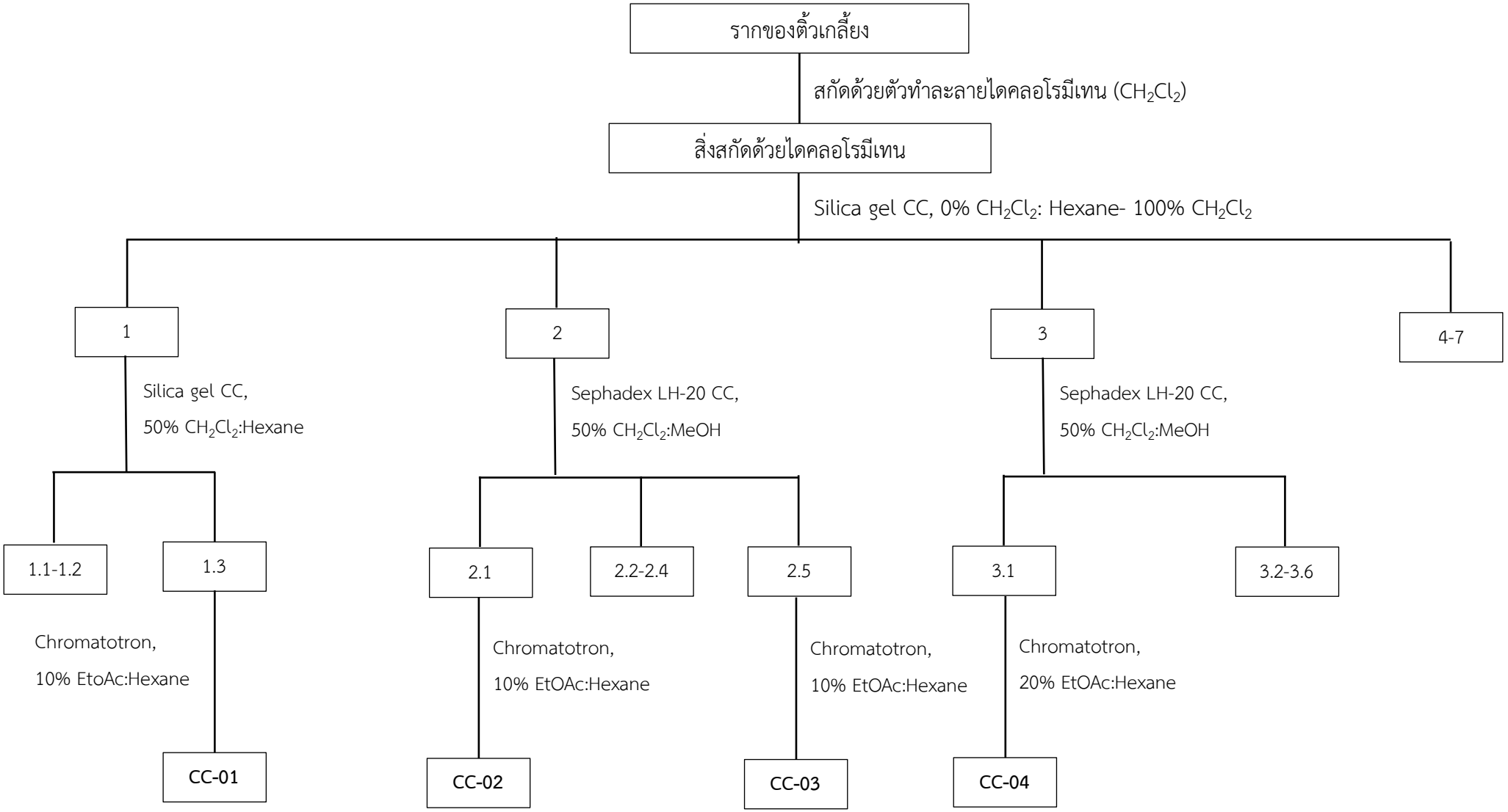
2. เติมเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไปใน 96-well culture plate

3. นำเซลล์มะเร็งที่อยู่ใน 96-well culture plate มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4. เติมสารบริสุทธิ์ที่ต้องการจะทดสอบและสารมาตรฐาน Doxorubicin ลงไปที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 2 µL ต่อ 1 หลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

5. เติม 10 µL ของสารละลาย 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ลงไป บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แยกเอา ส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่เหลือมาละลายด้วย DMSO 150 µL และเติม 0.1 M glycine ปริมาตร 25 µL ลงไป

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่า IC_{50}



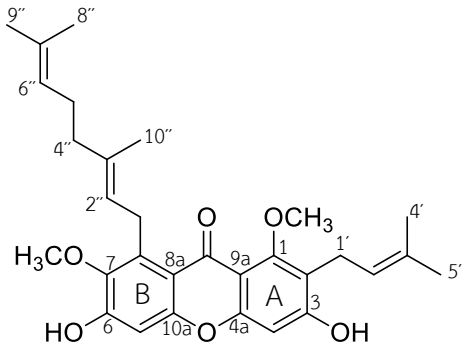
แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัดและแยกสารประกอบของเปลือกรากติ้วเกลี้ยง

บทที่ 3

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการทดลองพบว่าในการสกัดสารจากแฟรกชั่น 1-7 ของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากเปลือกรากติ้วเกลี้ยง พบว่าแฟรกชั่น 1-3 สามารถแยกสารทั้งหมด 4 ชนิด โดยเป็นสารใหม่ 1 ชนิด และสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว 3 ชนิด และแฟรกชั่น 4-7 มีปริมาณที่น้อยและไม่พบแฟรกชั่นที่น่าสนใจ สำหรับการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จะอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอน (^{1}H-NMR) และคาร์บอน (^{13}C-NMR) กับสารที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้

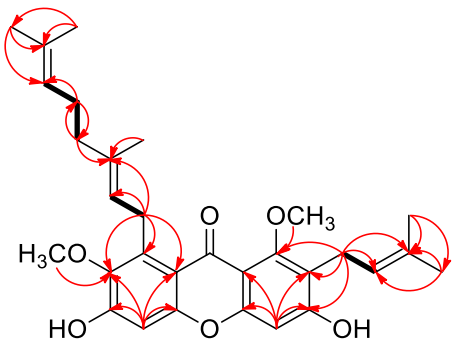
3.1.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CC-01



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสาร **CC-01**

สาร **CC-01** ดังรูปที่ 3.1 ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลืองเข้ม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{30}H_{36}O_6$ จากการวัด HRESIMS พบไอออนพีคที่ (m/z) 493.2582 $[M-H]^+$ (จากการคำนวณ $C_{30}H_{37}O_6$ ได้ 493.2590) จาก^{1}H- NMR (400 MHz, $CDCl_3$) แสดงค่า chemical shift ที่ δ_H 6.35 (*s*, 1H, H-4) และ δ_H 6.84 (*s*, 1H, H-5) แสดงถึงโปรตอนบนวงอะโรมาติก 2 วง ที่ δ_H 5.23 (*m*, 1H, H-2′) เป็นสัญญาณของโอเลฟินิกโปรตอนบนหมู่พรีนิล ที่ δ_H 3.35 (*d*, *J* = 7.2, 2H, H-1′) เป็นสัญญาณของเมทิลีนโปรตอนบนหมู่พรีนิล ที่ δ_H 1.68 (*s*, 3H, H-4′) และ 1.79 (*s*, 3H, H-5′) เป็นสัญญาณของเมทิลโปรตอนบนหมู่พรีนิล 2 หมู่ จากข้อมูล HMBC ดังรูปที่ 3.2 และตารางที่ 3.1 ยังพบว่าตำแหน่ง H-1′ (δ_H 3.35) มีความสัมพันธ์กับ C-1, C-2 และ C-3 ซึ่งเป็นคาร์บอนบนวงอะโรมาติกพบว่าหมู่พรีนิลแทนที่อะโรมาติกวง A บนหมู่เจอรานิลจะพบโอเลฟินิกโปรตอน 2 หมู่ ที่ δ_H 5.26 (*m*, 1H, H-2″) และ 5.10 (*m*, 1H, H-6″) หมู่เมทิลลีน 3 หมู่ ที่ δ_H 4.10 (*d*, *J* = 7.2, 2H, H-1″), δ_H 2.03 (*m*, 4H, H-4″ และ H-5″) และหมู่เมทิล 3 หมู่ ที่ δ_H 1.83 (*s*, 3H, H-10″), 1.68 (*s*, 3H, H-8″), และ 1.67 (*s*, 3H, H-9″) หมู่เมท็อกซี 2 หมู่ สเปกตรัมของสาร **CC-01** กับสาร

norcowanin[16] พบว่ามีความใกล้เคียงกัน ยกเว้นหมู่ไฮดรอกซี ที่ตำแหน่ง C-1 ถูกแทนที่ด้วยหมู่เมท็อกซี จากข้อมูล HMBC หมู่เมท็อกซีที่ δ_H 3.90 (*s*, 3H) แทนที่ที่ตำแหน่ง C-1 และ ที่ δ_H 3.80 (*s*, 3H) เป็นสัญญาณของหมู่เมท็อกซีที่แทนที่ C-7 ของวงอะโรมาติกวง B ดังนั้นสาร **CC-01** จึงเป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยให้ชื่อว่า cratochinone B



รูปที่ 3.2 ข้อมูล HMBC (ลูกศรหัวเดียว) และ COSY (เส้นทึบ) ของโครงสร้าง **CC-01**

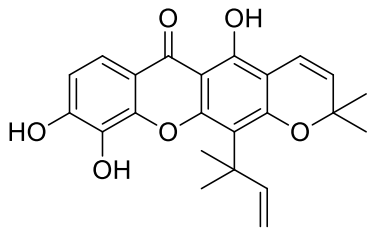
ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR (400 MHz) และ ^{13}C-NMR (100 MHz) ของสาร **CC-01**

ตำแหน่ง	สาร CC-01 ($CDCl_3$)		
	δ_H	δ_C	HMBC
1	-	163.9	-
2	-	111.9	-
3	-	159.3	-
4	6.35, (*s*, 1H)	89.2	C-2, C-3, C-4a, C-9a
5	6.84, (*s*, 1H)	101.9	C-6, C-7, C-8a, C-10a
6	-	155.4	-
7	-	143.0	-
8	-	137.8	-
9	-	183.2	-
4a	-	155.7	-
8a	-	112.2	-
9a	-	103.3	-

ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR (400 MHz) และ ^{13}C-NMR (100 MHz) ของสาร **CC-01** (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร CC-01 ($CDCl_3$)		
	δ_H	δ_C	HMBC
10a	-	154.9	-
1′	3.35, (*d*, *J*=7.2, 2H)	21.8	C-1, C-2, C-3, C-2′, C-3′
2′	5.23, (*m*, 1H)	122.7	C-4′, C-5′
3′	-	131.6	-
4′	1.68 (*s*, 3H)	25.4	C-2′, C-5′
5′	1.79 (*s*, 3H)	18.6	C-2′, C-4′
1″	4.10 (*d*, *J* = 7.2, 2H)	26.2	C-7, C-8, C-8a, C-2″, C-3″
2″	5.26 (*m*, 1H)	125.4	C-9″
3″	-	135.7	-
4″	2.03 (*m*, 4H)	32.3	C-3″, C-5″
5″	2.03 (*m*, 4H)	27.2	C-3″, C-5″
6″	5.10 (*m*, 1H)	123.6	C-5″, C-8″, C-10″
7″	-	132.1	-
8″	1.68 (*s*, 3H)	23.4	C-6″, C-7″, C-10″
9″	1.67 (*s*, 3H)	14.5	C-2″, C-3″, C-4″
10″	1.83 (*s*, 3H)	18.6	C-6″, C-7″, C-8″
1-OCH_3	3.90 (*s*, 3H)	56.3	C-1
7-OCH_3	3.80 (*s*, 3H)	61.9	C-7

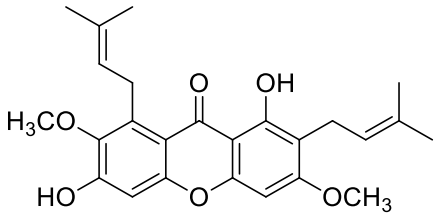
3.1.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CC-02



รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสาร **CC-02**

สาร **CC-02** ดังรูปที่ 3.3 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{14}H_{10}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CC-02** กับสาร macluraxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CC-02** คือ macluraxanthone[17]

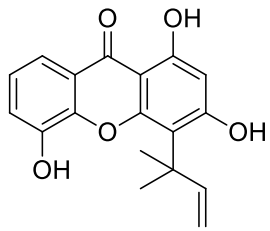
3.1.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CC-03



รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร **CC-03**

สาร **CC-03** ดังรูปที่ 3.4 มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{18}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CC-03** กับสาร β-mangostin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CC-03** คือ β-mangostin[18]

3.1.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร CC-04



รูปที่ 3.5 โครงสร้างของสาร **CC-04**

สาร **CC-04** ดังรูปที่ 3.5 มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{18}H_{16}O_5$ จากข้อมูลสเปกตรัม ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **CC-04** กับสาร pancixanthone A พบว่า มีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **CC-04** คือ pancixanthone A[19]

3.1.9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการนำสารทั้งหมด (**CC-01 – CC-04**) ที่แยกได้โดยวิธีทางเทคนิคโครมาโทกราฟี มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ KB, Hela S-3 และ HepG2 พบว่าได้ผลตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**CC-01 – CC-04**) และสารมาตรฐาน Doxorubicin

สาร	ค่า IC_{50} (μM)		
	KB	Hela S-3	Hep G2
CC-01	1.54 ± 0.02	0.91 ± 0.21	1.72 ± 0.10
CC-02	1.60 ± 0.02	1.85 ± 0.19	9.57 ± 0.74
CC-03	24.99 ± 3.16	14.383 ± 2.67	N.T
CC-04	> 100	> 100	N.T
Doxorubicin	0.22 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.99 ± 0.17

$IC_{50} \leq 10$ μM = ฤทธิ์ดี 10 μM ≤ $IC_{50} \leq 30$ μM = ฤทธิ์ปานกลาง 30 μM ≤ $IC_{50} < 100$ μM = ฤทธิ์อ่อน $IC_{50} \geq 100$ μM = ไม่มีฤทธิ์ และ N.T = ไม่ได้ทดสอบ

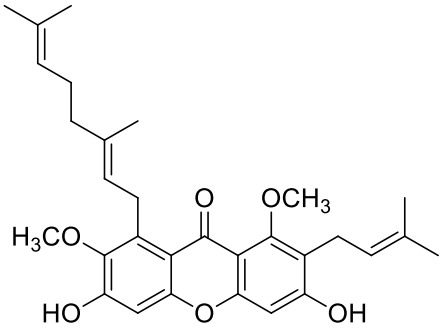
จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB พบว่า สาร **CC-01** และ **CC-02** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.54 และ 1.60 μM ตามลำดับ ส่วนสาร **CC-03** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.99 μM สาร **CC-04** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB โดยมี ค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM

จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 พบว่า สาร **CC-01** และ **CC-02** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.91 และ 1.85 μM ตามลำดับ ส่วนสาร **CC-03** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.383 สาร **CC-04** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 โดยมี ค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM

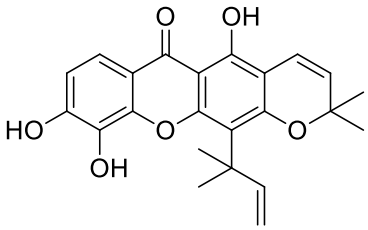
จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Hep G2 พบว่า สาร **CC-01** และ **CC-02** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.72 และ 9.57 μM ตามลำดับ ส่วน **CC-03** และ **CC-04** ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 มากกว่า 10 μM

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

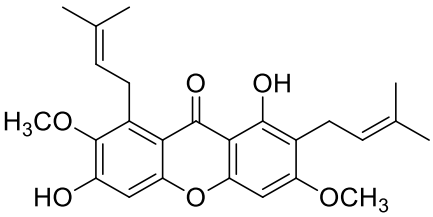
จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกรากติ้วเกลี้ยงมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี พบว่าแยกได้สารใหม่ในกลุ่มแซนโทน (xanthone) 1 ชนิด คือ cratochinone B (**CC-01**) นอกจากนี้พบสารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 3 ชนิด คือ macluraxanthone (**CC-02**), β-mangostin (**CC-03**) และ pancixanthone A (**CC-04**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ Hep G2 พบว่าสาร **CC-01** และ **CC-02** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, Hela S-3 และ Hep G2 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 0.91-9.57 μM สาร **CC-03** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 14.383-24.99 μM ส่วนสาร **CC-04** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งชนิด KB และ Hela S-3 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM



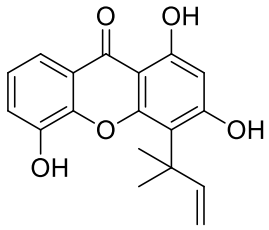
CC-01



CC-02



CC-03



CC-04

รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารที่แยกได้ **CC-01 – CC-04**

ข้อเสนอแนะ

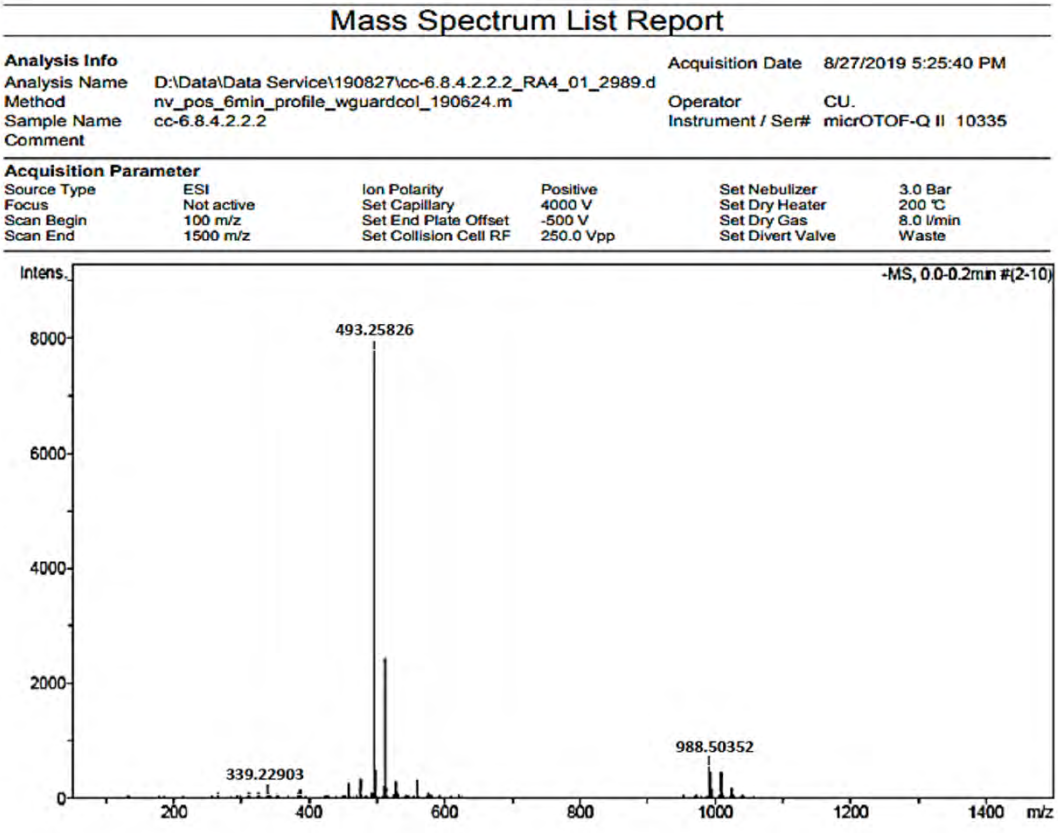
1. ในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้แยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเวลาที่จำกัดดังนั้นควรแยกในส่วนนี้อีกต่อไป
2. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนเพียงชนิดเดียวเพื่อการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และอาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดอื่นๆ เช่น เมทานอล, เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เป็นต้น
3. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจ

เอกสารอ้างอิง

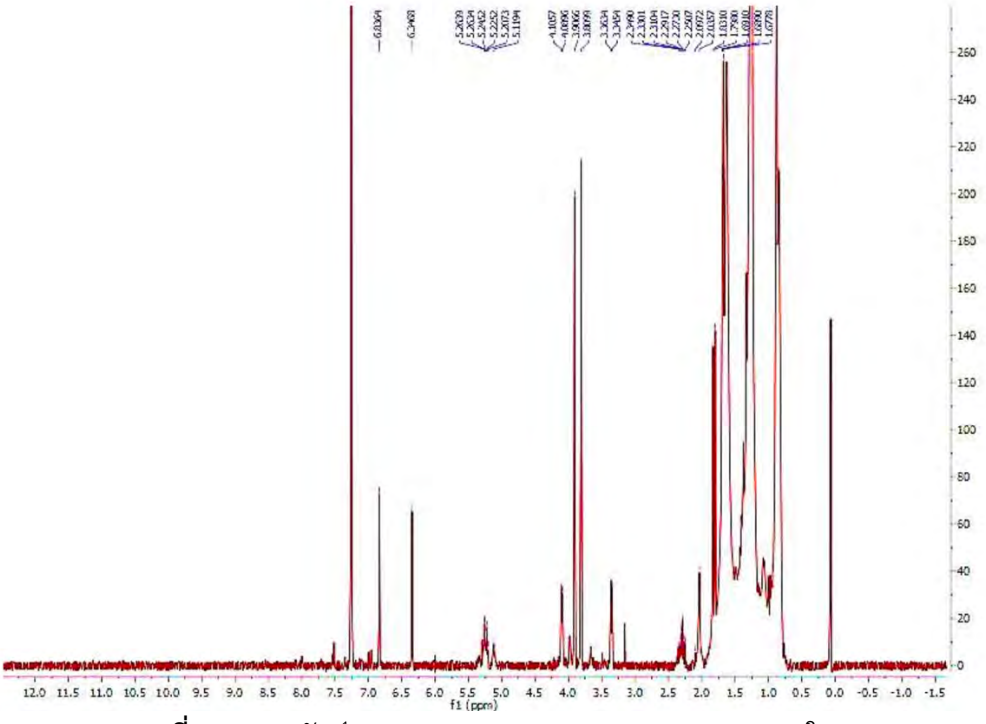
1. Thu, Z.M.; Aung, H.T.; Sein, M.M.; Maggiolini, M.; Lappano, R.; Vidari G. Highly cytotoxic xanthone from Cratoxylum cochinchinense collected in Myanmar. *Natural Product Communications* **2017**, *12*, 1759-1762.
2. Reutrakul, V.; Anantachoke, N.; Pohmakotr, M.; Jaipetch, T.; Sophasan, S.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Napaswat, C. Santisuk, T.; Tuchinda, P., Cytotoxic and anti-HIV-1 caged xanthones from the resin and fruits of Garcinia hanburyi. *Planta Medica* **2007,** *73* (1), 33-40.
3. โครงการจัดทำฐานข้อมูลพืชสมุนไพรที่สำรวจและวิจัยใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช “ติ้วเกลี้ยง”. https://home.kku.ac.th/orip2/thaiherbs/index.php/2013-05-04-04-14-43/32-2013-05-07-09-39-56 (accessed February 12 2020).
4. องค์การสานพฤษศาสตร์. [online] ติ้วเกลี้ยง http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=228 (accessed 20 March 2020)
5. Peng, L. Z.; Hun, S. Y.; Uddin, Z.; Wang, Y.; Hun, P. K. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and *α*-glucosidase by xanthones from *Cratoxylum cochinchinense*, and their kinetic characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 737-746.
6. Mahabusarakam, W.; Rattanaburi, S.; Phongpaichit, S.; Kanjana-Opas, A., Antibacterial and cytotoxic xanthones from *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry Letters* **2008,** *1* (4), 211-214.
7. Laphookhieo, S.; Maneerat, W.; Narmdokmai, W.; Koysomboon, S. Cytotoxic and antimalarial prenylated xanthones from *Cratoxylum cochinchinense*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *54*, 745-747.
8. Natrsanga, P.; Jongaramruong, J.; Rassamee, K.; Siripong, P.; Tip-Pyang, S., Two new xanthones from the roots of *Cratoxylum cochinchinense* and their cytotoxicity. *Journal of Natural Medicines* **2019**.
9. Phuwapraisirisan, P.; Udomchotphruet, S.; Surapinit, S.; Tip-pyang, S. Antioxidant xanthones from *Cratoxylum cochinchinense*. *Natural Product Research* **2006**, *20*, 1332-1337.

10. Udomchotphruet, S.; Phuwapraisirisan, P.; Sichaem, J.; Tip-pyang, S. Xanthones from the stems of Cratoxylum cochinchinense. *Phytochemistry* **2012**, *73*, 148-151.
11. Ito, C.; Matsui, T.; Niimi, A.; Tan, H.T.-W.; Itoigawa, M. Four new xanthones from Cratoxylum cochinchinense and their invitro antiproliferative effects. *Planta Medica* **2017**, *83*, 812-818.
12. Smith, I.; Seakins, J. W. T. b - Introduction to Paper and Thin-Layer Chromatography. Paper and Thin Layer Chromatography (Fourth Edition) 1976. pp. 5- 11.
13. Zhao, Y.; Ouyang, X.; Chen, J.; Zhao, L.; Qiu, X. Separation of aromatic monomers from oxidatively depolymerized products of lignin by combining Sephadex and silica gel column chromatography. *Separation and Purification Technology* **2018**, *191*, 250-256.
14. Desai, H. K.; Joshi, B. S.; Panu, A. M.; Pelletier, S. W. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using the Chromatotron. *Journal of Chromatography A* **1985**, *322*, 223-227.
15. Dharmaratne, H. R. W.; Napagoda, M. T.; Tennakoon, S.B. Xanthones from roots of *Calophyllum thwaitesii* and their bioactivity. *Natural Product Research* **2009**, *23* (6), 539-545.
16. Pattalung, P. N.; Thongtheeraparp, W.; Wiriyachitra, P.; Taylor, W. C. Xanthones of *Garcinia cowa*. *Planta Medica* **1994**, *60* (4), 365-368.
17. Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Yonemori, S. Two xanthones from root bark of *Calophyllum inophyllum* **1994**, *35* (2), 527-532.
18. Sim, W. C.; Lian, G. C.; Aspollah, S. M. Alpha-mangostin and beta-mangostin from *Cratoxylum laucum*. *Research Journal of Chemistry and Environment* **2011**, *15* (2), 62-66.
19. Ito, C.; Miyamoto, Y.; Rao, K. S.; Furukawa, H. A Novel Dibenzofuran and Two New Xanthones from *Calophyllum panciflorum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1996**, *44* (2), 441-443.

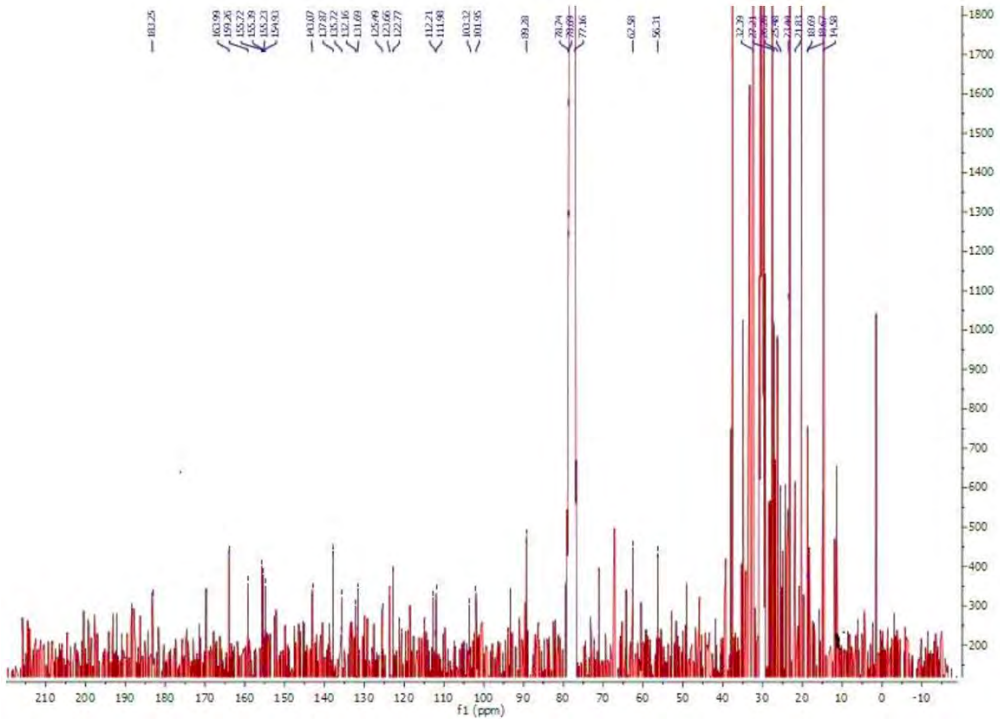
ภาคผนวก



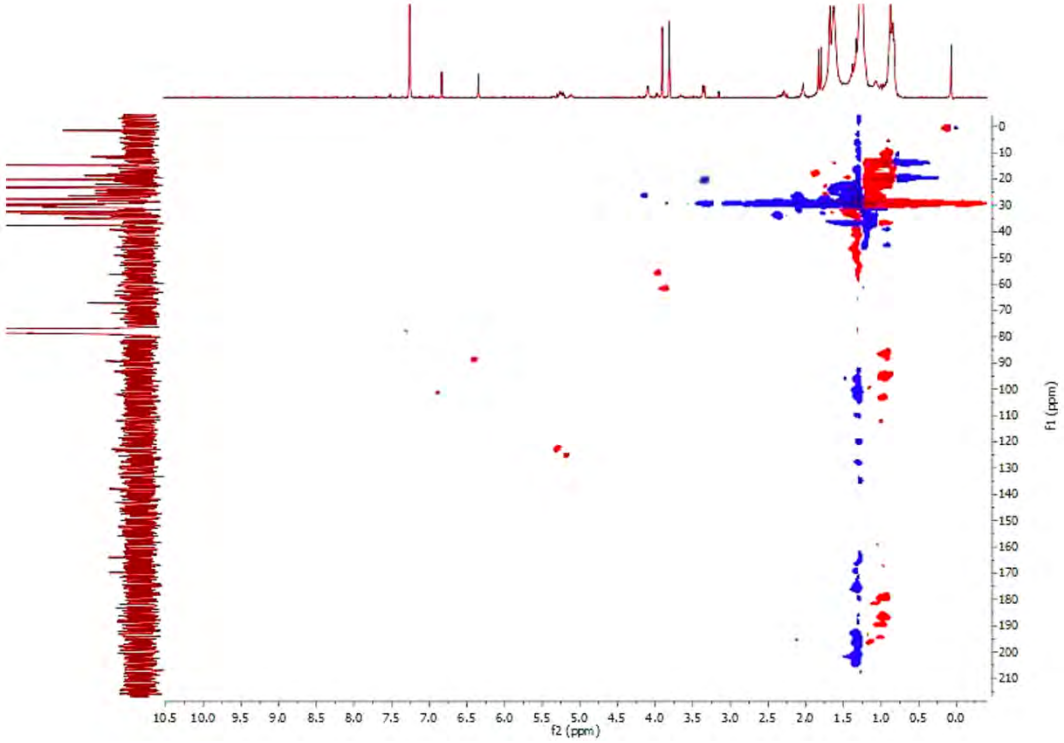
รูปที่ 1 สเปกตรัม HRESIMS ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$



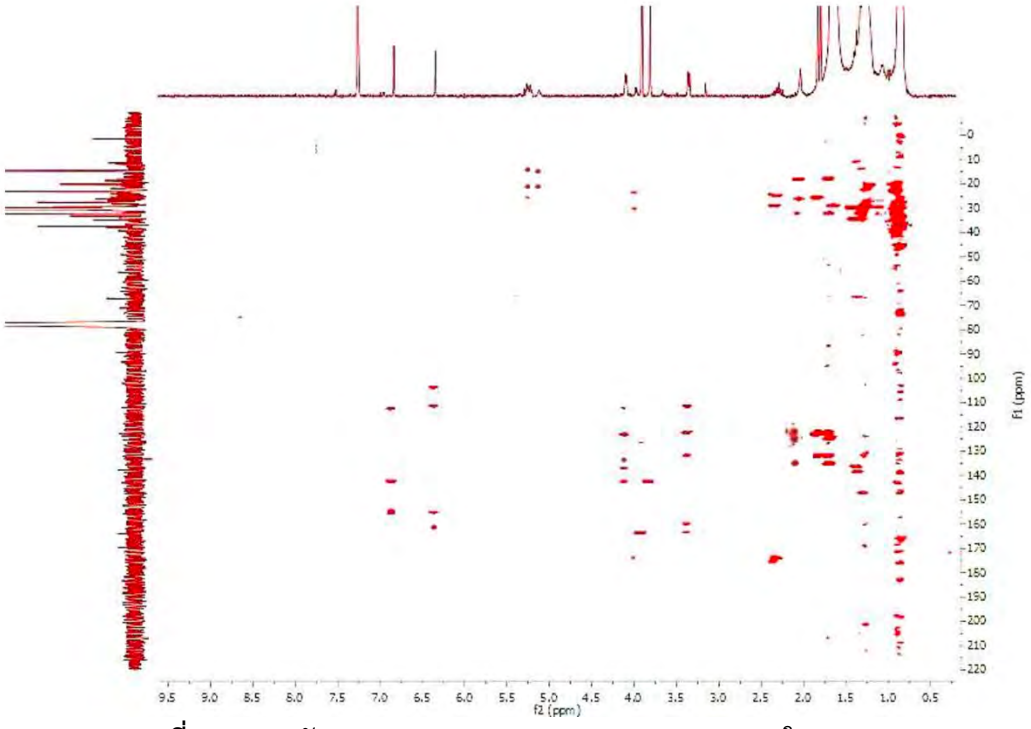
รูปที่ 2 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$



รูปที่ 3 สเปกตรัม ^{13}C-NMR ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$



รูปที่ 4 สเปกตรัม HSQC ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$



รูปที่ 5 สเปกตรัม HMBC ของ cratochinone B (**CC-01**) ใน $CDCl_3$

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวกิตติมา เอกฉันท์ เกิดเมื่อวันที่ 17 เดือน เมษายน พ.ศ. 2541 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนวิสุทธรังษี จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2558 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 127/4 หมู่4 ตำบลหนองขาว อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี รหัสไปรษณีย์ 71110 อีเมล kittima_meen@hotmail.com