

- Weber, N. D., Anderson, D. O., North, J. A., Merray, B. K., Lawson, L. D. and Hughes, B. G. 1992. In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med.* 58, 417-423.
- Yoosook C., Panpisutchai Y., Chaichana S., Santisuk T., and Reutrakul, V. 1999. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. *J. Ethnopharmacol.* 67, 179-187.
- Zheng, M. S. and Lu, Z. Y. 1990. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on *Herpes simplex virus*. *Chinese Med J* 103, 160-5.

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สกัดแยกสารบริสุทธิ์จากพืชตัวอย่าง
2. วิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. ทดสอบฤทธิ์ต้าน HSV ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืช 3 ชนิดที่นำมาศึกษา ได้แก่

ต้นสายวิสูตร (*Dendrobium falconeri* Hook.)

เปลือกต้นมะเก็ม (*Canarium subulatum* Guillaumin)

เปลือกกรากมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.)

3.2 วิธีการสกัดสาร

เตรียมสิ่งสกัดหยาบโดยการแช่ตัวอย่างพืชแห้งในสารละลายที่เหมาะสม เช่น ไดคลอโรมีเทนหรือเมธานอล จากนั้นนำสิ่งสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมในหลอดทดลอง นำสิ่งสกัดหยาบที่มีค่า % inhibition สูงกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทาง chromatography ในหลายรูปแบบจนได้สารบริสุทธิ์ โดยพืชแต่ละชนิดได้สิ่งสกัดหยาบดังนี้

สายวิสูตร 800 กรัม ได้สิ่งสกัดหยาบชั้นเมธานอล 73 กรัม

เปลือกต้นมะเก็ม 2.5 กิโลกรัม ได้สิ่งสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน 17 กรัมและสิ่งสกัด

หยาบชั้นเมธานอล 185 กรัม

เปลือกกรากมะหาด 2.4 กิโลกรัม ได้สิ่งสกัดหยาบชั้นเอธิลอะซีเตต 111 กรัมและสิ่งสกัด

หยาบชั้นเมธานอล 369 กรัม

3.2.1 การสกัดสารบริสุทธิ์จากสายวิสูตร

นำสิ่งสกัดหยาบในชั้นเมธานอล (73 g) มาแยกโดยวิธี vacuum liquid chromatography โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ๒๕ ด้วยเฮกเซน เอธิลอะซีเตต และเมธานอล ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้ว เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 500 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 36 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ภายใต้แสง UV รวมส่วนที่ให้ผลการตรวจแยกคล้ายกันไว้ด้วยกัน ได้เป็น 11 ส่วน ได้แก่ ส่วน A-K นำส่วน D (2.34 g) มาแยกต่อด้วย flash column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ๒๕ ด้วยไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้วและจากนั้น๒๕ด้วยเอธิลอะซีเตต และเฮกเซน อัตราส่วน 1 ต่อ 4 เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 200 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 33 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี TLC ภายใต้แสง UV รวมส่วนที่ให้ผลการตรวจแยกคล้ายกันไว้ด้วยกันได้ 13 ส่วน ได้แก่ส่วน I-XIII นำส่วนที่ IV (99 mg) มาแยกซ้ำด้วย gel filtration (sephadex LH20) ๒๕ ด้วยเมธานอล และแยกต่อด้วย column chromatography (CC) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ๒๕ ด้วยไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนอัตราส่วน 1:1 ได้สาร docosanoyl (*E*)-ferulate (3) (24 mg) นำส่วนที่ VIII (154 mg) มาแยกผ่าน sephadex LH20 ๒๕ ด้วยอะซีโตนและแยกซ้ำด้วย column chromatography (ซิลิกาเจล; ไดคลอโรมีเทน) ได้สาร tetracosanoyl (*Z*)-*p*-coumarate (4) (20 mg) ส่วนที่ IX (124 mg) เมื่อนำมาแยกด้วย CC ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ๒๕ ด้วยไดคลอโรมีเทน เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 50 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 19 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี TLC ภายใต้แสง UV นำส่วนที่ 2-10 มารวมกันได้แล้วระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำได้สาร tetracosanoyl (*E*)-*p*-coumarate (5) (27 mg) นำส่วน F (1.19 g) มาแยกต่อด้วย CC โดยใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ ๒๕ ด้วยของผสมระหว่างเอธิลอะซีเตตและเฮกเซน อัตราส่วน 1 ต่อ 4 เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 200 มิลลิลิตร ได้จำนวน 25 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี TLC ภายใต้แสง UV รวมส่วนที่ 15-19 เข้าด้วยกันแล้วแยกผ่าน sephadex LH 20 ๒๕ ด้วยอะซีโตนและแยกซ้ำด้วย CC (ซิลิกาเจล; เอธิลอะซีเตตต่อเฮกเซน, 1:4) ได้สาร *p*-hydroxybenzaldehyde (6) (10 mg) นำส่วน I (1.51 g) มาแยกด้วย CC ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ๒๕ ด้วยของผสมระหว่างเอธิลอะซีเตตและเฮกเซน ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้วเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 200 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 35 ส่วน เมื่อนำส่วนที่ 20-21 และ 27 มาระเหยแห้งจะได้สาร *p*-hydroxybenzoic acid (7) (110 mg) และ 2-(*p*-hydroxyphenyl)ethyl *p*-coumarate (8) (29 mg) นำส่วนที่ 25 (216 mg) มาแยกผ่าน sephadex LH20 ๒๕ ด้วยเมธานอล ได้สาร dendrofalconerol A (1) (29 mg) และ dendrofalconerol B (2) (12 mg) ตามลำดับ

3.2.2 การสกัดสารบริสุทธิ์จากเปลือกมะเกี๋ยม

นำสิ่งสกัดหยาบในชั้นไดคลอโรมีเทนของเปลือกมะเกี๋ยม (3.5 g) มาผ่านคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ะด้วยเฮกเซนและเอธิลอะซีเตตในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้ว เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 300 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 41 ส่วน นำส่วนที่ 8 (335 mg) มาผ่าน recycle preparative HPLC ะด้วยคลอโรฟอร์ม ได้สาร β -amyrin (9) (68 mg) นำส่วนที่ 21-24 (330 mg) ซึ่งมาลักษณะคล้ายคลึงกันบนแผ่น TLC มารวมกัน แล้วทำการแยกต่อด้วย Sephadex LH20 ะด้วยคลอโรฟอร์มและ recycle preparative HPLC ะด้วยคลอโรฟอร์ม ได้สาร (-)-cubebin (10)

นำสิ่งสกัดหยาบในชั้นเมธานอล (150 g) มาแยกโดยวิธี vacuum liquid chromatography โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ะด้วยเอธิลอะซีเตตและอะซีโตนมีน้ำผสม 1% ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้ว จากนั้นเปลี่ยนเป็นอะซีโตนและเมธานอลมีน้ำผสม 1% ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้ว เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 500 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 54 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ภายใต้อสง UV รวมส่วนที่ให้ผลการตรวจแยกคล้ายกันไว้ด้วยกัน ได้เป็น 9 ส่วน ได้แก่ ส่วน A-I นำส่วน A (1.68 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ะด้วยเอธิลอะซีเตตและเฮกเซน ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้ว เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 200 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 31 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี TLC ภายใต้อสง UV รวมส่วนที่ให้ผลการตรวจแยกคล้ายกันไว้ด้วยกันได้ 9 ส่วน ได้แก่ส่วน A1-A9 นำส่วน A5 (258 mg) มาผ่าน Sephadex LH20 ะด้วยอะซีโตนและผ่าน recycle preparative HPLC ะด้วยคลอโรฟอร์ม ได้สาร scopoletin (11) (5 mg) นำส่วน A6 (135 mg) และ A8 (138 mg) มาผ่าน Sephadex LH20 ะด้วยอะซีโตนได้สาร 3,4-dihydroxybenzoic acid (12) (135 mg) และ gallic acid (13) (15 mg) ตามลำดับ นำส่วน E (6.5 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ะด้วยเอธิลอะซีเตตและอะซีโตนมีน้ำผสม 1% ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้ว เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 500 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 52 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ภายใต้อสง UV รวมส่วนที่ให้ผลการตรวจแยกคล้ายกันไว้ด้วยกัน ได้เป็น 8 ส่วน ได้แก่ ส่วน E1-E8 เมื่อนำส่วน E2 มาตกผลึกซ้ำด้วยเมธานอลได้สาร 3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O- α -L-rhamnopyranoside (14) (58 mg) นำส่วน E3 (661 mg) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ะด้วย 10-15 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 200 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 44 ส่วน นำส่วนที่ 29-30 (302 mg) มารวมกันแล้วแยกซ้ำด้วย Sephadex LH20 ที่ ะด้วย เมธานอลได้สาร 3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O- β -D-glucoopyranoside (15) (5 mg) นำส่วน E4 (609 mg) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ะด้วย 10-15 % เมธา

นอลในไดคลอโรมีเทน จากนั้นแยกซ้ำด้วย Sephadex LH20 ที่ชะด้วยเมธานอลได้สาร 3-*O*-methyllellagic acid-4'-*O*- α -L-arabinofuranoside (16) (5 mg) นำส่วน E5 (387 mg) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 5-10 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน จากนั้นแยกซ้ำด้วย Sephadex LH20 ที่ชะด้วยเมธานอลได้สาร scopolin (17) (18 mg) ส่วน E6 (526 mg) เมื่อนำมาแยกด้วย Sephadex LH20 โดยชะเมธานอลได้สาร 3'-*O*-methyllellagic acid-4-*O*- β -D-xylopyranoside (18) (3 mg)

3.2.3 การสกัดสารบริสุทธิ์จากเปลือกรากมะหาด

นำสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซีเตต (111 g) มาแยกโดยวิธี vacuum liquid chromatography โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ชะด้วยเฮกเซนและเอธิลอะซีเตต ในลักษณะค่อยๆเพิ่มขั้วเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 500 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 60 ส่วน ตรวจสอบการแยกโดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ภายใต้แสง UV รวมส่วนที่ให้ผลการตรวจแยกคล้ายกันได้ด้วยกัน ได้เป็น 13 ส่วน ได้แก่ ส่วน A-M นำส่วน E (3.86 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 15-20% เอธิลอะซีเตตและเฮกเซน เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 500 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 13 ส่วนจากนั้นนำส่วนที่ 8 (101 mg) มาแยกต่อด้วย Sephadex LH20 ชะด้วยอะซีโตนได้สาร artolakoochol (19) (40 mg) ส่วน G (3.57 g) เมื่อนำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 10% เอธิลอะซีเตตและเฮกเซน เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 500 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 24 ส่วน เมื่อนำส่วนที่ 9 (22 mg) มาแยกต่อด้วย Sephadex LH20 ชะด้วยอะซีโตนได้สาร cycloartolakoochol (20) (5.7 mg) นำส่วน J (1.76 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 30% เอธิลอะซีเตตและเฮกเซน เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 400 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 18 ส่วนจากนั้นนำส่วนที่ 14 (254 mg) มาแยกต่อด้วย flash column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 1-3% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 100 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 10 ส่วน เมื่อนำส่วนที่ 7 (7.3 mg) มาตกผลึกซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทนได้สาร 4-hydroxyartolakoochol (21) (2.5 mg) นำส่วน K (8.9 g) มาแยกต่อโดยวิธี vacuum liquid chromatography โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ชะด้วยเมธานอลร้อยละ 3 ในไดคลอโรมีเทนเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 400 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 7 ส่วนจากนั้นนำส่วนที่ 2 (528 mg) มาแยกต่อด้วย Sephadex LH20 ชะด้วยเมธานอลและไดคลอโรมีเทนอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทำการแยกต่อด้วย flash column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยอะซีโตนร้อยละ 3 ในไดคลอโรมีเทนได้สาร 5,7,2',4'-tetrahydroxy-3-prenyl-6-geranylflavone (22)