บทสรุปของโครงการ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ของพรรณไม้และสมุนไพรนานาชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ จึงได้มีการศึกษารวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับพรรณไม้และสมุนไพรมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพรรณไม้และสมุนไพรหลายชนิดยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นเพื่อสร้างความแข็งแรงในการใช้ภูมิปัญญาโดยการมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รับรองถึงประโยชน์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจากการค้นคว้าพบว่าพืชในสกุล *Dasymaschalon* มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดหนึ่ง คือ บุหลงดอกแหลม (*Dasymaschalon acuminatum*) ซึ่งยังไม่มีผู้ทำการศึกษาวิจัย คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าเป็นการเร่งด่วนที่ควรจะได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลเผยแพร่ให้นักศึกษาและบุคคลทั่วไปได้ทราบและเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาวิธีการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของบุหรงดอกแหลม

2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การจัดเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อการสกัด

ทำการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนแยกออกจากกัน คือส่วนใบและกิ่งของต้นบุหรงดอกแหลม และนำไปตากให้แห้งโดยอากาศ จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดเพื่อความสะดวกในการสกัด ทำการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ เฮกเซน (hexane) แล้วสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง เอทิลอะซีเตต (ethyl acetate) และสุดท้ายเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือเมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแช่กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) สารสกัดหยาบที่ได้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น ซึ่งจากผลการทดสอบดังกล่าวจะถูกนำมาพิจารณาว่าส่วนใดของพืชที่น่าสนใจนำมาศึกษาต่อไป

3.2 การสกัด

ทำการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ เฮกเซน (hexane) แล้วสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางเอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) และสุดท้ายเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือเมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแช่กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator)

จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ ส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย การต้านเชื้อวัณโรค และทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (vero cell) เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) พบว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ได้ดี ดังนั้น นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ดังกล่าวไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยแยกส่วนสกัดหยาบเป็นส่วนย่อยด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี จนได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

4. ผลการดำเนินงานของโครงการ

จากการสกัดสารจากใบและกิ่งของบุหลงดอกแหลม ได้สารสกัดหยาบ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และ เมทานอลตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดจากใบและกิ่งบุหลงดอกแหลม

สารสกัดหยาบ	เฮกเซน	เอทิลอะซีเตต	เมทานอล
ใบ	129.7 กรัม	15.74 กรัม	30.6 กรัม
กิ่ง	98.78 กรัม	10.23 กรัม	12.34 กรัม

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด ได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อมาลาเรีย, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)

สารสกัดหยาบ	**ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (IC_{50}, μg/ml)**	**ความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{50}, μg/ml)**		
		มะเร็งในช่องปาก (KB)	มะเร็งเต้านม (MCF-7)	มะเร็งปอด (NCI-H187)
เฮกเซน (ใบ)	-	inactive	inactive	inactive
เอทิลอะซีเตต (ใบ)	3.29	23.39	inactive	inactive
เมทานอล (ใบ)	4.75	44.64	inactive	inactive
เฮกเซน (กิ่ง)	-	inactive	inactive	inactive
เอทิลอะซีเตต (กิ่ง)	4.48	inactive	inactive	inactive
เมทานอล (กิ่ง)	4.43	inactive	inactive	inactive
Mefloquine	0.0285	-	-	-
Ellipticine	-	1.20	NT	3.81
Tamoxifen	-	NT	8.23	NT

จากผลการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยแยกส่วนสกัดหยาบเป็นส่วนย่อยด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี จนได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

การแยกและหาสูตรโครงสร้างของสารจากสารสกัดหยาบ

ใบบุหลงดอกแหลม

สารสกัดเอทิลอะซีเตต

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตต (15.0 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 7 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 2 (247.6 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 131.1 มิลลิกรัม

นำกลุ่มที่ 3 (806.0 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้ 4 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 3.1-3.4) นำกลุ่มย่อย 3.2 (338.9 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 273.5 มิลลิกรัม นำกลุ่มย่อย 3.3 (411.3 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ galangin 5-methyl ether (**4**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 68.0 มิลลิกรัม

นำกลุ่มที่ 7 (1.84 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท (80:20) จากนั้นตามด้วยคอลัมน์ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (20:80) ได้ 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย7.1-7.3) นำกลุ่มย่อย 7.2 มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้ 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย7.2.1-7.2.3) นำกลุ่มย่อย 7.2.2 (723.0 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ dicentrinone (**2**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 7.1 มิลลิกรัม

สารสกัดเมทานอล

นำสารสกัดเมทานอล (30.0 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 6 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 3 (3.45 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สาร 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 3.1-3.3) นำกลุ่มย่อย 3.3 (2.54 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (97:3) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ galangin 5-methyl ether (**4**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 321.4 มิลลิกรัม และ 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) 1.35 กรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตท

นำกลุ่มที่ 5 (10.3 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้ 3กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 5.1-5.3) นำกลุ่มย่อย 5.2 (2.73 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้ 4 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 5.2.1-5.2.4) นำกลุ่มย่อย 5.2.2 (51.5 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ silica reversphase RP-18 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-น้ำ (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 7-*epi*-duguetine (**1**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 46.8 มิลลิกรัม นำกลุ่มย่อย 5.2.4 (1.00 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ silica reversphase RP-18 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-น้ำ (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3′-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (**3**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 7.3 มิลลิกรัม

กิ่งบุหลงดอกแหลม

สารสกัดเอทิลอะซีเตต

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตต (10 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 5 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 2 (839.2 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (100:1) จากนั้นตามด้วยคอลัมน์ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100% ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ galangin 5-methyl ether (**4**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 220.5 มิลลิกรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ นำกลุ่มที่ 3 (895.0 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100% ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 154.5 มิลลิกรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ

นำกลุ่มที่ 5 (1.16 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100%จากนั้นตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ dicentrinone (**2**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ และ 7-(*O*)-acetylduguetine (**7**) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 7.1 มิลลิกรัม

สารสกัดเมทานอล

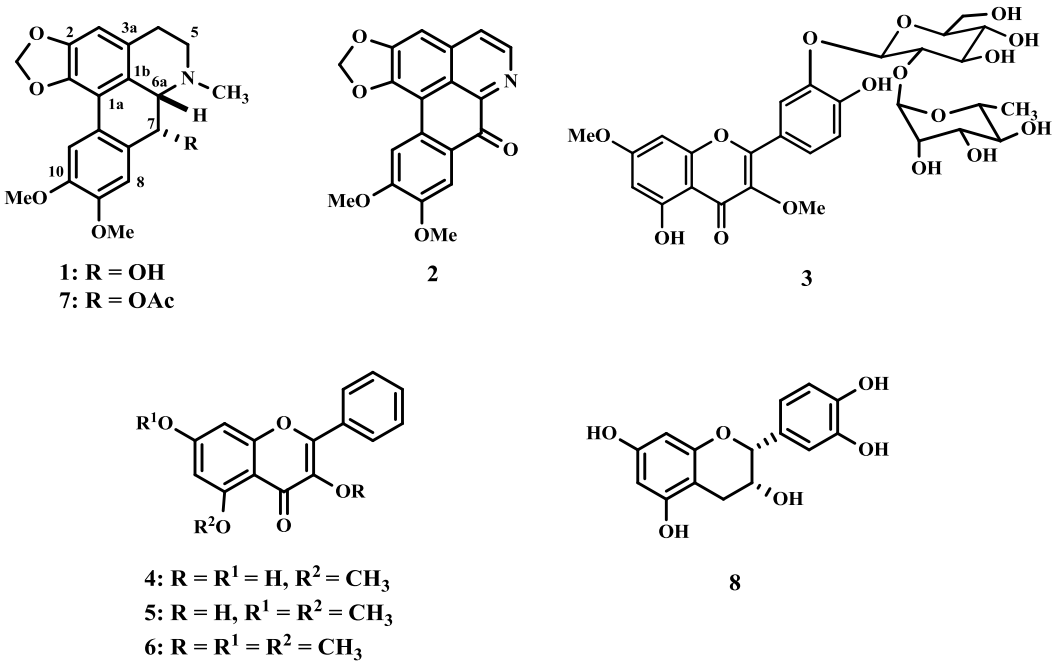
นำสารสกัดเมทานอล (12.0 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 6 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 2 (735.2 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ (-)-epicatechin (**8**) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 13.5 มิลลิกรัม

นำกลุ่มที่ 3 (1.78 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100%จากนั้นตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3′-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (**3**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 5.7 มิลลิกรัม และ 7-*epi*-duguetine (**1**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 17.1 มิลลิกรัม ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด เคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ

5. สรุปและอภิปรายผล

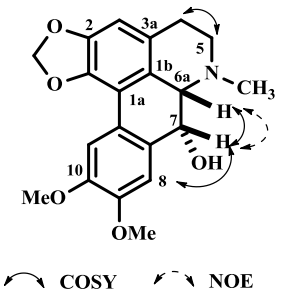
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของบุหลงดอกแหลม (*Dasymaschalon acuminatum*) จากส่วนใบและกิ่งสามารถแยกสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ 7-*epi*-duguetine (**1**) และ 7-(*O*)-acetylduguetine (**7**) และรวมทั้งสารที่เคยพบมาแล้วอีกในกลุ่มแอลคาลอยด์ 1 ชนิด คือ dicentrinone (**2**)[1] และในกลุ่มฟลาโวนอยล์ 5 ชนิด คือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3′-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (**3**)[2], galangin 5-methyl ether (3,7-dihydroxy- 5-methoxyflavone) (**4**)[3], 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**)[4], 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**)[5] และ (-)-epicatechin (**8**)[6] ดังรูปภาพ 1 โครงสร้างของสารใหม่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สำหรับโครงสร้างของสารที่เคยพบมาแล้วยืนยันได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและข้อมูลทางกายภาพที่ได้กับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้แล้ว



รูป 1: โครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบและกิ่งบุหลงแหลม

สารประกอบ **1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีค่าการหมุนระนาบแสงจำเพาะ $[\alpha]_D^{29}$ -46.6° (c = 0.59, $CHCl_3$) จากข้อมูลอินฟาเรดสเปกตรัมปรากฏแถบการดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3440 cm^{-1} จากข้อมูลแมสสเปกตรัมให้พีค molecular ion ที่ m/z 356.1447 $[M + H]^+$ ใน HR ESI MS สเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{21}NO_5$ จากข้อมูล ^{1}H- และ ^{13}C-NMR (ตาราง 2) พบสัญญาณ singlet ของหมู่ OCH_3 2 หมู่ ที่ δ 3.91 เกิดการแทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 9 (δ_c 149.5) และ 10 (δ_c 148.9) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ singlet 2 สัญญาณ ของโปรตอน methylenedioxy ที่ δ 5.93 และ 6.09 และ สัญญาณ singlet 3 สัญญาณ ที่ δ 6.51, 6.95 และ 7.70 ของ H-3, H-8 และ H-11 ตามลำดับ สามารถยืนยันได้จากรูปแบบการแทนที่ของวงอะโรมาติก

จากข้อมูล ^{1}H-NMR พบสัญญาณโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิล และ เมทิลที่เชื่อมต่อกับไนโตรเจน ที่ δ 5.01 และ 2.69 สารประกอบ **1** แสดงลักษณะเฉพาะของสารกลุ่ม aporphine alkaloid แบบ 1,2-methylenedioxy จากสัญญาณ carbinolic ที่ δ_H 4.87 (*d*, *J* = 2.1 Hz) ถูกแทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 7 ซึ่งจากข้อมูล ^{1}H-^{1}H COSY (รูป 2) H-7 มีความสัมพันธ์กับ H-6 และจากข้อมูล HMBC H-7 มีความสัมพันธ์กับ C-1b, C-6a, C-7a C-8 and C-11a (Table 1) การยืนยันสเตอริโอเคมีที่ C-6a พบว่ามีการจัดเรียงแบบ *R* จากข้อมูล circular dichroism (CD) ซึ่งมีค่า negative Cotton effect ที่ 242 nm นอกจากนี้ยังสังเกตได้จากค่าคงที่การคู่ควบซึ่งมีค่า $J_{6a,7}$ = 2.1 Hz เป็นแบบซิส ที่แตกต่างจากทรานส์ ($J_{6a,7}$ = 12 Hz) ในรูปไอโซเมอร์[7] จากการยืนยันข้อมูล NOE พบว่า H-6a (δ_H 3.39) และ H-7 (δ_H 4.87) มีความสัมพันธ์ต่อกัน พบว่าการจัดเรียงตัวที่ C-7 เป็นแบบ *R* การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ ^{1}H- และ ^{13}C-NMR ของ (–)-duguetine จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ **1** ที่ C-7 เป็น epimer ของ (–)-duguetine คือ 7-*epi*-duguetine



รูป 2: ข้อมูล COSY และ NOE ความสัมพันธ์ของสารประกอบ **1**

สารประกอบ **7** มีลักษณะเป็น amorphous สีเหลือง มีค่าการหมุนระนาบแสงจำเพาะ $[\alpha]_D^{29}$ -71.5° (*c* = 0.38, $CHCl_3$) จากข้อมูลอินฟาเรดสเปกตรัมพบแถบการยืดของหมู่คาร์บอนนิลที่ 1737 cm^{-1} จากข้อมูลแมสสเปกตรัมให้พีค molecular ion ที่ m/z 398.1578 $[M + H]^+$ ใน HR ESI MS สเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{24}NO_6$ จากข้อมูล ^{1}H- และ ^{13}C-NMR (ตาราง 3) ของสารประกอบ **7** มีความคล้ายคลึงกับ 7-*epi*-duguetine (**1**) เป็นอย่างมาก แต่จุดที่แตกต่างกันพบว่าเกิดการแทนที่ของหมู่ acetyl ที่ตำแหน่ง 7 ของสาร **1** จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ **7** คือ 7-(*O*)-acetylduguetine

ตาราง 2 ข้อมูล ^{1}H-, ^{13}C-NMR และ HMBC ของสาร **1** ใน $CDCl_3$

Position	7-*epi*-Duguetine (**1**)		
	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	HMBC
1	-	142.7	-
1a	-	115.8	-
1b	-	120.7	-
2	-	147.3	-
3	6.51 (*s*)	107.0	C-1, C-1b, C-2, C-4
3a	-	128.1	-
4	3.14*, 2.66*	26.3	C-1b, C-3a, C-5
5	3.21*, 2.78 (*dd*, 10.4, 3.2)	53.2	C-3a, C-4, C-6a, N-CH_3
6a	3.39 (*br s*)	66.4	C-1b, N-CH_3
7	4.87 (*d*, 2.1)	65.2	C-1b, C-6a, C-7a, C-8, C-11a
7a	-	127.7	-
8	6.95 (*s*)	112.6	C-7, C-7a, 9-OCH_3
9	-	149.5	-
10	-	148.9	-
11	7.70 (*s*)	110.8	C-1a, C-7a, C-11a, 10-OCH_3
11a	-	123.0	-
N-CH_3	2.69 (*s*)	43.2	C-5, C-6a
O-CH_2-O	6.09 (*s*), 5.93 (*s*)	100.8	C-1, C-2
9-OCH_3	3.91 (*s*)	56.0	C-9
10-OCH_3	3.91 (*s*)	55.9	C-10

*สัญญาณซ้อนทับกัน

ตาราง 3 ข้อมูล ^{1}H-, ^{13}C-NMR และ HMBC ของสาร **1** ใน $CDCl_3$

Position	7-(*O*)-Acetylduguetine (**7**)		
	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	HMBC
1	-	143.1	-
1a	-	115.2	-
1b	-	115.6	-
2	-	148.8	-
3	7.07 (*s*)	106.5	C-1, C-1b, C-2, C-4
3a	-	125.7	-
4	3.14*, 2.66*	26.1	C-1b, C-3a, C-5
5	3.21*, 2.80*	54.2	C-3a, C-4, C-6a, N-CH_3
6a	6.31 (*br s*)	64.8	C-1b, N-CH_3
7	7.24 (*br s*)	77.3	-
7a	-	123.4	-
8	7.07 (*s*)	113.1	C-7, C-9
9	-	150.4	-
10	-	148.8	-
11	7.70 (*s*)	110.3	C-1a, C-7a, C-11a, 10-OCH_3
11a	-	122.5	-
N-CH_3	3.11 (*s*)	42.0	C-5, C-6a
O-CH_2-O	6.17 (*s*), 6.02 (*s*)	100.5	C-1, C-2
9-OCH_3	3.91 (*s*)	56.1	C-9
10-OCH_3	3.92 (*s*)	55.8	C-10
7-OCO$\underline{C}H_3$	2.19 (*s*)	21.9	C-7O$\underline{C}OCH_3$
7-O$\underline{C}OCH_3$	-	171.7	

*สัญญาณซ้อนทับกัน

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ที่ทำการทดสอบคือ ฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อมาลาเรีย, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)

สารสกัดหยาบ	ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (IC_{50}, μg/ml)	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{50}, μg/ml)		
		มะเร็งในช่องปาก (KB)	มะเร็งเต้านม (MCF-7)	มะเร็งปอด (NCI-H187)
7-*epi*-Duguetine (**1**)	0.385	7.54	15.37	inactive
Dicentrinone (**2**)	1.23	inactive	inactive	inactive
3,7-Dimethyl ether 3′-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (**3**)	inactive	inactive	inactive	inactive
Galangin 5-methyl ether (**4**)	3.12	inactive	inactive	inactive
5,7-Dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**)	5.07	inactive	inactive	inactive
3,5,7-Trimethoxyflavone (**6**)	inactive	inactive	inactive	inactive
7-(*O*)-Acetylduguetine (**7**)	0.243	26.81	inactive	5.71
(-)-Epicatechin (**8**)	inactive	inactive	inactive	inactive
Mefloquine	0.011	-	-	-
Ellipticine	-	1.20	NT	3.81
Tamoxifen	-	NT	8.23	NT

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียพบว่า สาร **7** และ **1** แสดงฤทธิ์สูงสุด (IC_{50} 0.243 และ0.385 μg/ml) ตามลำดับ ในขณะที่สาร **2**, **4** และ **5** แสดงฤทธิ์ปานกลางที่ค่า IC_{50} 1.23, 5.07 and 3.12 μg/ml สาร **3**, **6** และ **8** ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน (mefloquine) IC_{50} 0.011 μg/ml สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสาร **1** แสดงฤทธิ์ได้สูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) (IC_{50} 7.54 μg/ml) และในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) (IC_{50} 15.37 μg/ml) ตามด้วยสาร **7** ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) (IC_{50} 5.71 μg/ml)