

## 4.2 อภิปรายและวิจารณ์ผล

1. ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของดอกงิ้วและใบงิ้ว ใช้ตัวอย่างเป็นดอกงิ้วที่เก็บในเดือนธันวาคม – มกราคม ตากแห้งแล้วบดเป็นผง ส่วนใบงิ้วเก็บในช่วงเดือนเมษายน ฝึงลมจนแห้งแล้วบดเป็นผง พบว่าในดอกงิ้วมีความชื้น 17.60 % เถ้า 4.57% โปรตีน 6.46 % ไขมัน 9.32 % เยื่อใย 22.60 % และคาร์โบไฮเดรต 39.45 % ส่วนในใบงิ้วแห้งมีความชื้น 10.53 % เถ้า 16.29 % โปรตีน 9.20% ไขมัน 1.96 % เยื่อใย 28.60 % และคาร์โบไฮเดรต 33.42 % เมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการกับดอกงิ้วแดงในตารางที่ 4.1 แล้วจะเห็นว่าทั้งดอกและใบงิ้วดอกขาวมีคุณค่าทางโภชนาการเช่นเดียวกับดอกงิ้วแดง แต่มีสารเยื่อใยสูงกว่า

2. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกงิ้วและใบงิ้วด้วย DPPH Assay

การทดลองครั้งแรกหาค่า  $IC_{50}$  ใช้ดอกงิ้วที่ตากแห้งบดละเอียด เข้มข้น 2.0458 mg/mL พบว่าให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.8247 mg/mL ในขณะที่สารละลายมาตรฐาน BHA เข้มข้น 0.0203 mg/mL ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.0161mg/mL

การทดลองครั้งที่ 2 หาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้ว พบว่าสารสกัดดอกงิ้วที่มีความเข้มข้น 0.0514 mg/mL ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.0457 mg/mL ส่วนสารสกัดเอทานอลของใบงิ้วที่มีความเข้มข้น 0.1870 mg/mL ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.1116 mg/mL ในขณะที่สารละลายมาตรฐาน BHA เข้มข้น 0.0235 mg/mL ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.0163 mg/mL จะเห็นว่าสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วและใบงิ้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยที่สารสกัดดอกงิ้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดใบงิ้ว แต่เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกงิ้วกับสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วพบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า

3. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบของดอกงิ้วในเอทิลแอลกอฮอล์ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ เป็นตัวชะ โดยเริ่มจากสภาพขั้วต่ำสุดแล้วค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้วให้สูงขึ้น ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่รองรับได้ด้วย TLC , เครื่อง NMR และ GC- MS พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคต่าง ๆ ทาง spectroscopy รายละเอียดของขั้นตอนต่าง ๆ มีดังนี้

(1) การเตรียมสารสกัดหยาบจากงิ้วดอกขาว

โดยนำงิ้วป่าดอกขาวแห้งบดละเอียด (2.02 kg) แช่ด้วยตัวทำละลาย EtOAc (3x10 L) ที่อุณหภูมิห้อง กรองและระเหยส่วนสกัดทั้งหมดภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้ส่วนสกัดหยาบ EtOAc มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มเหนียวหนืด (32.01 g) คิดเป็น 1.61% ของน้ำหนักดอกงิ้วแห้ง กากที่เหลือสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย  $CH_3OH$  (2x10 L) ที่อุณหภูมิห้องกรองและระเหยส่วนสกัดทั้งหมดภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้ส่วนสกัดหยาบ  $CH_3OH$  มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ( 190.4511 g) คิดเป็น 9.42 % ของน้ำหนักดอกงิ้วแห้ง

(2) การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากจิ้งหว้าป่าดอกขาว แยกส่วนสกัดหยาบ EtOAc จากจิ้งหว้าป่าดอกขาว (32.01 g) ซึ่งดูดซับอยู่กับ silica gel (64.02 g) ด้วยวิธี column chromatography ใช้ silica gel (70-230 mesh ASTM, 1.4 kg,  $\square$  X สูง: 8.5 cm x 50 cm) เป็นตัว adsorbent ละ column ด้วยสารละลายในอัตราส่วนต่างๆ กัน โดยเริ่มจาก hexane hexane-EtOAc EtOAc EtOAc-MeOH และ MeOH ตามลำดับ เก็บสารละลายครั้งละประมาณ 500 ml รวม fraction ที่มี TLC คล้ายกันได้ fractions ที่น่าสนใจ 14 fractions ดังนี้ BC-2-(1-5) (0.0736 g) BC-2-(6-7) (1.1000 g) BC-2-(8-13) (0.0114 g) BC-2-(14-17) (0.4700 g) BC-2-(18-19) (0.3780 g) BC-2-(20-21) (1.6870 g) BC-2-(22-23) (3.6200 g) BC-2-(24-25) (1.5280 g) BC-2-(26-27) (1.5600 g) BC-2-28 (0.0991 g) BC-2-(29-30) (1.0100 g) BC-2-31 (0.0447 g) BC-2-(32-36) (1.5000g) และ BC-2-(37-44) นำ fraction ที่สนใจไปแยกต่อด้วย column chromatography หรือ preparative thin-layer chromatography (PTLC) พบสาร 6 ชนิดด้วยกัน คือ 2-butoxyethyl acetate (**BC1**) 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (scopoletin) (**BC2**) 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid) (**BC4**) 4-hydroxybenzoic acid (**BC5**) 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (syringaldehyde) (**BC6**) และ (3E)-2,6-dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol (**BC7**)

fraction BC-2-28 ได้ของหนืดสีเขียวของสาร **BC1** (0.0991 g)

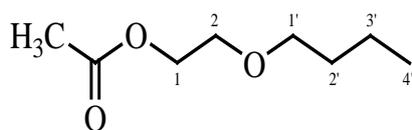
แยก fraction BC-2-(32-36) (1.6 g) ด้วย column chromatography ใช้ silica gel(230-400 mesh ASTM, 22.6 g,  $\square$  Xสูง: 4.8 cm x 25 cm) เป็นตัว adsorbent ละ column ด้วยสารละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH เป็น developing solvent รวม fractions ที่มี TLC เหมือนกันได้ 4 fractions ดังนี้ BC-3-(1-5) (0.0948 g) BC-3-6 (0.2910 g) BC-3-7 (0.3620 g) และ BC-3-(8-18) (0.9390 g) แยก fraction BC-3-6 (0.2910 g) ต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel (230-400 mesh ASTM, 14.25 g,  $\square$  Xสูง: 1.1 cm x 30 cm) เป็นตัว adsorbent และละ column ด้วยสารละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH เป็น developing solvent รวม fractions ที่มี TLC เหมือนกันได้ 3 fractions ดังนี้ BC-4-(1-30) (22 mg) BC-4-(31-53) (19.5 mg) และ BC-4-(54-93) (253.7 mg) fractions BC-4-(31-53) มีลักษณะผลึกขนนกสีเหลืองของสาร **BC2** (5 mg)

แยก fraction BC-2-31 (0.0447 g) ด้วย column chromatography ใช้ silica gel (230-400 mesh ASTM, 31.4 g,  $\square$  Xสูง: 2.0 cm x 20 cm) เป็นตัว adsorbent และละ column ด้วยสารละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH เป็น developing solvent รวม fractions ที่มี TLC เหมือนกันได้ 7 fractions ดังนี้ BC-5-(1-14) (15.6 mg) BC-5-15 (59.7 mg) BC-5-(16-28) (222 mg) BC-5-(29-36) (66.2 mg) BC-5-(37-49) (42.9 mg) BC-5-50 (2.9 mg) และ BC-5-(51-95) (80.4 mg) สำหรับ fractions BC-5-15 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองของสาร **BC6** (59.7mg) และ BC-5-50 เป็นของแข็งไม่มีสีของสาร **BC5** (2.9 mg)

แยก fraction BC-3-7 (0.3620 g) ต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel (230-400 mesh ASTM, 31.17 g,  $\square$  สูง: 2.3 cm x 15 cm) เป็นตัว adsorbent และชะ column ด้วยสารละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH เป็น developing solvent รวม fractions ที่มี TLC เหมือนกันได้ 3 fractions ดังนี้ BC-8-(1-18) (84.8 mg) BC-8-(19-24) (148.9 mg) และ BC-8-(25-53) (144.1 mg) แยก fraction BC-8-(19-24) (148.9 mg) ต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel (60 RP-18, 7.85 g,  $\square$  สูง: 1.0 cm x 20 cm) เป็นตัว adsorbent และชะ column ด้วยสารละลาย 30% MeOH in  $\text{H}_2\text{O}$  เป็น developing solvent รวม fractions ที่มี TLC เหมือนกันได้ 3 fractions ดังนี้ BC-9-(1-3) (41.1 mg) BC-9-4 (26.6 mg) และ BC-9-(5-16) (39.6 mg) fractions BC-9-4 เป็นของเหลวชั้น เหนียวหนืดสีเหลืองของสาร **BC7** (16 mg)

(3) การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบ BC1 - BC7 ด้วย  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ผลการวิเคราะห์เรียงตามลำดับ คือ

#### 2-Butoxyethyl acetate (BC1)



**BC1**

สารประกอบ **BC1** มีลักษณะเป็น colorless viscous oil จากการวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC1** แสดงว่าสาร **BC1** มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_3$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 160

$^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC1** พร้อมวิเคราะห์รายละเอียดได้ด้วยการทำ  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY DEPT  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ของสาร **BC1** แสดงข้อมูลในตารางที่ **BC1-1** และแสดงให้เห็นถึง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ในภาพที่ **BC1-1** และ ภาพที่ **BC1-2** ตามลำดับ

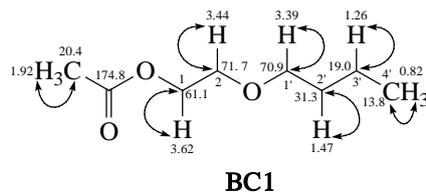
จาก  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร **BC1** แสดงว่ามีจำนวน carbons 8 อะตอม สำหรับ multiplicities ของสัญญาณของ carbon ได้จาก DEPT experiment พบสัญญาณของ carbonyl carbon 1 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  174.8 ปรากฏสัญญาณของ methylene carbon 5 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  1.7 70.9 61.1 31.3 และ 19.0 และนอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ methyl carbon 2 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  20.4 และ 13.8

$^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC1** พบสัญญาณเป็น singlet 1 สัญญาณ ที่  $\delta$  1.92 ของหมู่ acetoxy ปรากฏสัญญาณของ triplet 2 ชุด ที่  $\delta$  3.62 ( $J=4.9$  Hz, H-1) และ  $\delta$  3.44 ( $J=4.9$  Hz, H-2) ของ methylene protons นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของหมู่ butoxy ปรากฏสัญญาณเป็น triplet ที่  $\delta$  3.39 (2H,  $J=6.8$  Hz, H-1') quintet ที่  $\delta$  1.47 (2H,  $J=7.1$  Hz, H-2') sextet ที่  $\delta$  1.26 (2H,  $J=7.5$  Hz, H-3') และ triplet ที่  $\delta$  0.82 (3H,  $J=7.5$  Hz, H-4')

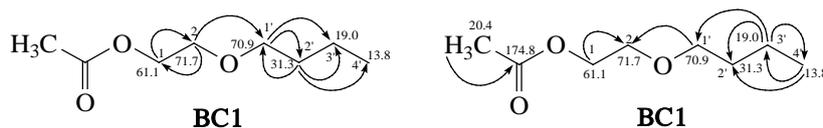
จากข้อมูลทาง NMR spectroscopy ข้างต้นพบว่าสาร **BC1** มีข้อมูลสอดคล้องกับ 2-butoxyethyl acetate จึงสรุปได้ว่าสาร **BC1** คือ 2-butoxyethyl acetate

ตารางที่ 4.1 **BC1-1** ข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC1** ใน  $\text{CDCl}_3$

position	chemical shift		correlation experiments	
	$^{13}\text{C}$ ppm	HMQC $^1\text{H}$ ppm ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)	DEPT	HMBC
1	61.1	3.62(2H, <i>t</i> , $J=4.9$ Hz)	CH <sub>2</sub>	71.7(C-2)
2	71.7	3.44(2H, <i>t</i> , $J=4.9$ Hz)	CH <sub>2</sub>	61.1(C-1) 70.9(C-1')
1'	70.9	3.39(2H, <i>t</i> , $J=6.8$ Hz)	CH <sub>2</sub>	19.0(C-3') 31.3(C-2') 71.7(C-2)
2'	31.3	1.47(2H, <i>quintet</i> , $J=7.1$ Hz)	CH <sub>2</sub>	13.8(C-4') 19.0(C-3') 70.9(C-1')
3'	19.0	1.26(2H, <i>sextet</i> , $J=7.5$ Hz)	CH <sub>2</sub>	13.8(C-4') 31.3(C-2') 70.9(C-1')
4'	13.8	0.82(3H, <i>t</i> , $J=7.5$ Hz)	CH <sub>3</sub>	19.0(C-3') 31.3(C-2')
1-OCOCH <sub>3</sub>	174.8		C	
1-OCOCH <sub>3</sub>	20.41.92(3H, <i>s</i> )		CH <sub>3</sub>	174.8(OCOCH <sub>3</sub> )

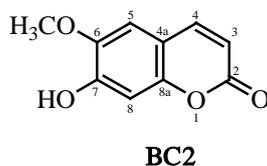


ภาพที่ 4.1 BC1-1 HMQC carbon-proton correlation ของสาร BC1 (ซึ่งด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )



ภาพที่ 4.2 BC1-2 HMBC carbon-proton correlation ของสาร BC1 ด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$  ไปยัง  $^{13}\text{C}$

### 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin (Scopoletin) (BC2)



สารประกอบ BC2 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง (yellow needles) หลอมเหลวที่  $203^\circ\text{C}$  (lit.<sup>7</sup> หลอมเหลวที่  $182$ - $184^\circ\text{C}$ ) จากการวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC2 แสดงว่าสาร BC2 มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192

$^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC2 พร้อมวิเคราะห์รายละเอียดได้ด้วยการทำ  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY DEPT  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ของสาร BC2 แสดงข้อมูลในตารางที่ BC2-1 และแสดงให้เห็นถึง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ในภาพที่ BC2-1 และ BC2-2 ตามลำดับ

จาก  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร BC2 แสดงว่ามีจำนวน carbons 10 อะตอม สำหรับ multiplicities ของสัญญาณของ carbon ได้จาก DEPT experiment พบสัญญาณของ carbonyl carbon 1 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  174.8 มีสัญญาณของ aromatic carbons ที่เป็น quaternary carbon 4 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  175.0 149.7 144.0 และ 111.5 methine carbon 2 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  19.0 และ

103.2 พบสัญญาณของ olefinic carbon 2 อะตอมที่  $\delta$  143.4 และ 113.4 นอกจากนี้ยังพบ methoxy carbon ที่ต่อกับ aromatic ring 1 อะตอม ที่  $\delta$  56.4 อีกด้วย

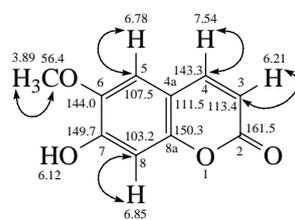
$^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC2** มีสัญญาณของ aromatic protons 2 สัญญาณปรากฏเป็น singlet 2 เส้น ที่  $\delta$  7.85 (H-8) และ 6.78 (H-5) พบสัญญาณของ olefinic protons ปรากฏเป็น doublet ที่  $\delta$  7.54 ( $J=9.5$  Hz, H-4)  $\delta$  6.21 ( $J=9.5$  Hz, H-3) มีสัญญาณเป็น broad singlet 1 สัญญาณของหมู่ phenolic hydroxyl 1 หมู่ ปรากฏที่  $\delta$  6.12 และพบสัญญาณเป็น singlet ของหมู่ methoxy 1 สัญญาณแสดงที่  $\delta$  3.89 (6-OCH<sub>3</sub>)

จากข้อมูลทาง spectroscopy ข้างต้นพบว่าสาร **BC2** มีข้อมูลสอดคล้องกับ 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (Scopoletin) (**BC2**)<sup>7,8,9,10</sup> จึงสรุปได้ว่าสาร **BC2** คือ 7-hydroxy-6-methoxycoumarin

ตารางที่ 4.2 **BC2-1** ข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC2** ใน CDCl<sub>3</sub>

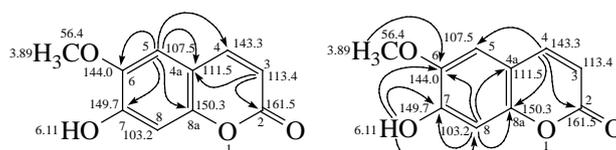
position	chemical shift		correlation experiments	
	$^{13}\text{C}$ ppm	HMQC $^1\text{H}$ ppm ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)	DEPT	HMBC
2	161.5		C	
3	113.4	6.21(1H, <i>d</i> , $J=9.5$ Hz)	CH	111.5(C-4a) 161.5(C-2)
4	143.4	7.54(1H, <i>d</i> , $J=9.5$ Hz)	CH	107.5(C-5) 150.3(C-8a) 161.5(C-2)
4a	111.5		C	
5	107.5	6.78(1H, <i>s</i> )	CH	111.5(C-4a) 143.4(C-4) 144.0(C-6) 149.7(C-7) 150.3(C-8a)
6	144.0		C	
7	149.7		C	
8	103.2	6.85(1H, <i>s</i> )	CH	111.5(C-4a)

				144.0(C-6)
				149.7(C-7)
				150.3(C-8a)
8a	150.3		C	
6-OCH <sub>3</sub>	56.4	3.89(3H, s, )	CH <sub>3</sub>	144.0(C-6)
7-OH		6.12(1H, bs)		103.2(C-8)
				144.0(C-6)
				149.7(C-7)



BC2

ภาพที่ 4.3 BC2-1 HMQC carbon-proton correlation ของสาร BC2 (ใช้ด้วยลูกศรระหว่าง <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C)

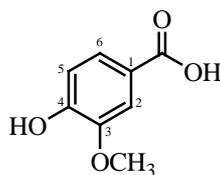


BC2

BC2

ภาพที่ 4.4 BC2-2 HMBC carbon-proton correlation ของสาร BC2 (ใช้ด้วยลูกศรระหว่าง <sup>1</sup>H ไปยัง <sup>13</sup>C)

#### 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (BC4)



BC4

สารประกอบ **BC4** มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (colorless needles) หลอมเหลวที่  $209^{\circ}\text{C}$  (lit.<sup>11</sup> หลอมเหลวที่  $212^{\circ}\text{C}$ ) จากการวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC4** แสดงว่าสาร **BC4** มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 168

$^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC4** พร้อมวิเคราะห์รายละเอียดได้ด้วยการทำ  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY DEPT  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ของสาร **BC4** แสดงข้อมูลในตารางที่ **BC4-1** และแสดงให้เห็นถึง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ในภาพที่ **BC4-1** และ **BC4-2** ตามลำดับ

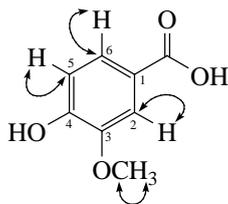
จาก  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร **BC4** แสดงว่ามีจำนวน carbons 8 อะตอม สำหรับ multiplicities ของสัญญาณของ carbon ได้จาก DEPT experiment ปรากฏสัญญาณของ carboxyl carbon 1 อะตอม ที่  $\delta$  170.4 พบสัญญาณของ aromatic carbons ที่เป็น quaternary carbon 3 อะตอม ปรากฏที่  $\delta$  150.7 146.2 และ 121.2 methine carbon 3 อะตอม ปรากฏที่  $\delta$  125.1 114.2 และ 112.2 นอกจากนี้ยังมีสัญญาณของ methoxy carbon 1 อะตอม ที่  $\delta$  55.7 อีกด้วย

$^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC4** มีสัญญาณของ aromatic proton 3 สัญญาณปรากฏเป็น doublet of doublet ที่  $\delta$  7.72 ( $J=8.3, 1.9$  Hz, H-6) เป็น doublet ที่  $\delta$  7.59 ( $J=1.9$  Hz, H-2) และ เป็น doublet ที่  $\delta$  6.97 ( $J=8.3$  Hz, H-5) พบสัญญาณเป็น singlet ของหมู่ methoxy 1 สัญญาณ แสดงที่  $\delta$  3.97 (3-OCH<sub>3</sub>) และพบสัญญาณเป็น broad singlet 1 สัญญาณของหมู่ phenolic hydroxyl 1 หมู่ ปรากฏที่  $\delta$  6.10 (4-OH)

จากข้อมูลทาง spectroscopy ข้างต้นพบว่าสาร **BC4** มีข้อมูลสอดคล้องกับ 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**BC4**)<sup>11,12</sup> จึงสรุปได้ว่าสาร **BC4** คือ 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid)

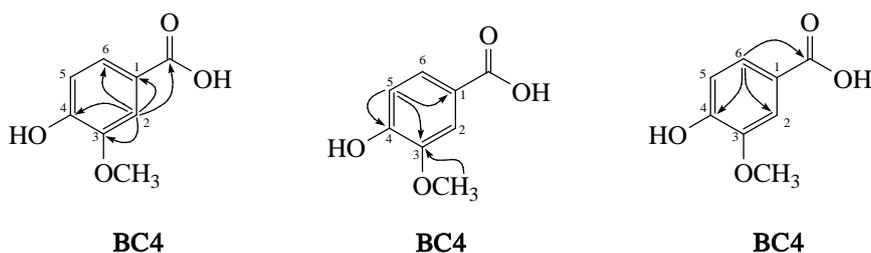
ตารางที่ 4.3 BC4-1 ข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC4 ใน  $\text{CDCl}_3$

position	chemical shift		correlation experiments	
	$^{13}\text{C}$ ppm	HMQC $^1\text{H}$ ppm ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)	DEPT	HMBC
1	121.2		C	
2	112.2	7.59(1H, <i>d</i> , $J=1.9$ Hz)	CH	121.2(C-1) 125.1(C-6) 146.2(C-3) 150.7(C-4) 170.4(C=O)
3	146.2		C	
4	150.7		C	
5	114.2	6.97(1H, <i>d</i> , $J=8.3$ Hz)	CH	121.2(C-1) 146.2(C-3) 150.7(C-4)
6	125.1	7.72(1H, <i>dd</i> , $J=8.3, 1.9$ Hz)	CH	112.1(C-2) 150.7(C-4) 170.4(C=O)
1-COOH	170.4		C	
3-OCH <sub>3</sub>	55.7	3.97(3H, <i>s</i> )	CH <sub>3</sub>	146.2(C-3)
4-OH	6.10H, <i>bs</i> )			



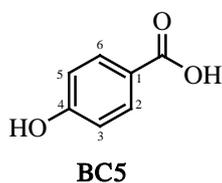
BC4

ภาพที่ 4.5 BC4-1 HMQC carbon-proton correlation ของสาร BC4 (ชี้ด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )



ภาพที่ 4.6 BC4-2 HMBC carbon-proton correlation ของสาร BC4 (ชี้ด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$  ไปยัง  $^{13}\text{C}$ )

#### 4-Hydroxybenzoic acid (BC5)

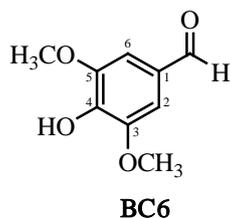


สารประกอบ BC5 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (colorless needles) หลอมเหลวที่  $212^\circ\text{C}$  (lit.<sup>13</sup> หลอมเหลวที่  $215^\circ\text{C}$ ) จากการวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC5 แสดงว่าสาร BC5 มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 138

$^1\text{H}$  NMR ของสาร BC5 มีสัญญาณของ aromatic proton 2 สัญญาณปรากฏเป็น doublet 2 ชุด ที่  $\delta$  7.84 ( $J=9.5$  Hz, H-3,H-5) และ  $\delta$  7.95 ( $J=9.5$  Hz, H-2,H-6)

จากข้อมูลทาง spectroscopy ข้างต้นพบว่าสาร BC5 มีข้อมูลสอดคล้องกับ 4-hydroxybenzoic acid (BC5)<sup>13,14</sup> จึงสรุปได้ว่าสาร BC5 คือ 4-hydroxybenzoic acid

#### 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (Syringaldehyde)(BC6)



สารประกอบ **BC6** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (yellow needles) จากการวิเคราะห์ ด้วย high resolution mass spectrum (positive HR TOFMS) ของสาร **BC6** แสดงว่าสาร **BC6** มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_9H_{10}O_4$  ซึ่งให้ ion peak ที่  $m/z$ : 183.0849[M+H]<sup>+</sup> calcd for  $C_9H_{10}O_4+H$  183.0652

$^{13}C$  NMR และ  $^1H$  NMR ของสาร **BC6** พร้อมวิเคราะห์รายละเอียดได้ด้วยการทำ  $^1H$ - $^1H$  COSY DEPT  $^1H$ - $^{13}C$  correlation (HMQC) และ  $^1H$ - $^{13}C$  correlation long-range coupling (HMBC) ของสาร **BC6** แสดงข้อมูลในตารางที่ 4.4 **BC6-1** และแสดงให้เห็นถึง  $^1H$ - $^{13}C$  correlation (HMQC) และ  $^1H$ - $^{13}C$  correlation long-range coupling (HMBC) ในภาพที่ 4.7 **BC6-1** และ **BC6-2** ตามลำดับ

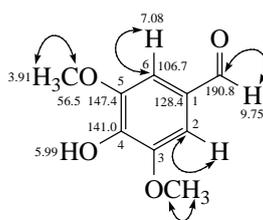
จาก  $^{13}C$  NMR spectrum ของสาร **BC6** พบว่ามีจำนวน carbons 9 อะตอม สำหรับ multiplicities ของสัญญาณของ carbon ได้จาก DEPT experiment พบสัญญาณของ carbonyl carbon 1 อะตอม ปรากฏที่  $\delta$  190.8 มีสัญญาณของ aromatic carbons ที่เป็น quaternary carbon 4 อะตอม ปรากฏที่  $\delta$  147.4(2C) 141.0 และ 128.4 methine carbon 2 อะตอม ปรากฏที่  $\delta$  106.7(2C) และปรากฏสัญญาณของ methoxy carbon 2 อะตอมที่  $\delta$  56.5 และ 56.5

$^1H$  NMR ของสาร **BC6** พบสัญญาณเป็น singlet ของ aldehyde ที่ต่อกับ aromatic ring ปรากฏ  $\delta$  9.75 มีสัญญาณของ aromatic proton 1 สัญญาณปรากฏเป็น singlet ที่  $\delta$  7.08 (H-2,H-6) พบสัญญาณเป็น singlet 1 สัญญาณของหมู่ phenolic hydroxyl 1 หมู่ ปรากฏที่  $\delta$  5.99 (4-OH) ยังพบสัญญาณเป็น singlet ของหมู่ methoxy 1 สัญญาณแสดงที่  $\delta$  3.91 (3-OCH<sub>3</sub>,5-OCH<sub>3</sub>)

จากข้อมูลทาง spectroscopy ข้างต้นพบว่าสาร **BC6** มีข้อมูลสอดคล้องกับ 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde<sup>14,15</sup> จึงสรุปได้ว่าสาร **BC6** คือ 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (syringaldehyde)

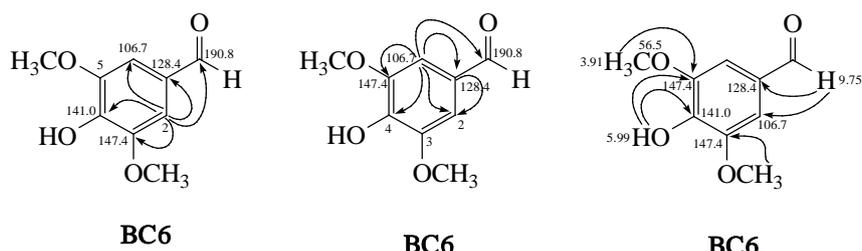
ตารางที่ 4.4 BC6-1 ข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC6 ใน  $\text{CDCl}_3$

position	chemical shift		correlation experiments	
	$^{13}\text{C}$ ppm	HMQC $^1\text{H}$ ppm ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)	DEPT	HMBC
1	128.4		C	
2	106.7	7.08(1H, <i>s</i> )	CH	106.7(C-6) 128.4(C-1) 141.0(C-4) 147.4(C-3) 190.8(1-CHO)
3	147.4		C	
4	141.0		C	
5	147.4		C	
6	106.7	7.08(1H, <i>s</i> )	CH	106.7(C-2) 128.4(C-1) 141.0(C-4) 147.4(C-5) 190.8(1-CHO)
1-CHO	190.8	9.75(1H, <i>s</i> )	CH	106.7(C-2,C-6) 128.4(C-1)
3-OCH <sub>3</sub>	56.5	3.91(3H, <i>s</i> )	CH <sub>3</sub>	147.4(C-3)
4-OH		5.99(1H, <i>bs</i> )	OH	141.0(C-4) 147.4(C-3,C-5)
5-OCH <sub>3</sub>	56.5	3.91(3H, <i>s</i> )	CH <sub>3</sub>	147.4(C-5)



BC6

ภาพที่ 4.7 BC6-1 HMQC carbon-proton correlation ของสาร BC6 (ซึ่งด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )



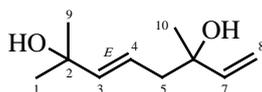
BC6

BC6

BC6

ภาพที่ 4.8 BC6-2 HMBC carbon-proton correlation ของสาร BC6 (ซึ่งด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$  ไปยัง  $^{13}\text{C}$ )

(3E)-2,6-Dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol (BC7)



BC7

สารประกอบ BC7 มีลักษณะเป็น colorless viscous oil จากการวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC7 แสดงว่าสาร BC7 มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 170

$^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC7 พร้อมวิเคราะห์รายละเอียดได้ด้วยการทำ  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY DEPT  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ของสาร BC7 แสดงข้อมูลในตารางที่ 4.5 BC7-1 และแสดงให้เห็นถึง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation (HMQC) และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation long-range coupling (HMBC) ในภาพที่ 4.9 BC7-1 และ BC7-2 ตามลำดับ

จาก  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร BC7 แสดงว่ามีจำนวน carbons 10 อะตอม สำหรับ multiplicities ของสัญญาณของ carbon ได้จาก DEPT experiment พบสัญญาณของ methine olefinic carbon 3 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  144.8 142.5 และ 121.7 มีสัญญาณของ terminal methylene carbon 1 อะตอม ปรากฏที่  $\square$  12.0 พบสัญญาณของ tertiary carbinol carbon 2 อะตอม

ปรากฏที่  $\delta$  72.8 และ 70.7 มีสัญญาณของ methylene carbon 1 อะตอม ปรากฏที่  $\delta$  45.0 นอกจากนี้ยังพบ methyl carbon อีก 3 อะตอม ที่  $\delta$  29.8 29.7 และ 27.4 อีกด้วย

$^1\text{H}$  NMR ของสาร **BC7** มีสัญญาณของ methine olefinic protons 3 สัญญาณ ปรากฏเป็น doublet of doublet ที่  $\delta$  5.93 ( $J=17.3, 10.8$  Hz, H-7) เป็น multiplet 2 ชุด ที่  $\delta$  5.70 (H-3) และที่  $\delta$  5.63 (H-4) และ  $\delta$  5.21 ( $J=1.18$  Hz, H-1) พบสัญญาณของ terminal olefinic methylene protons 2 สัญญาณ ปรากฏเป็น doublet of doublet 2 ชุด ที่  $\delta$  6.21 ( $J=17.3, 1.2$  Hz, H<sub>b</sub>-8) และที่  $\delta$  5.06 ( $J=10.7, 1.2$  Hz, H<sub>a</sub>-8) พบสัญญาณของ aliphatic methylene protons 1 สัญญาณปรากฏเป็น multiplet ที่  $\delta$  2.26 (H-5) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ aliphatic tertiary methyl protons ปรากฏเป็น singlet 2 สัญญาณ ที่  $\delta$  1.31 (1-CH<sub>3</sub>, 9-CH<sub>3</sub>) และที่  $\delta$  1.28 (10-CH<sub>3</sub>) อีกด้วย และ พบสัญญาณเป็น broad singlet ของหมู่ hydroxyl 2 หมู่ ปรากฏที่  $\delta$  2.40 (2-OH, 8-OH)

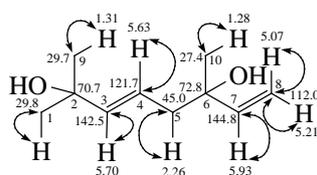
จากข้อมูลทาง spectroscopy ข้างต้นพบว่าสาร **BC7** มีข้อมูลสอดคล้องกับ (3*E*)-2,6-dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol<sup>16</sup> จึงสรุปได้ว่าสาร **BC7** คือ (3*E*)-2,6-dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol

ตารางที่ 4.5 BC7-1 ข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR และ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร BC7 ใน  $\text{CDCl}_3$

position	chemical shift			correlation experiments	
	$^{13}\text{C}$ ppm	HMQC $^1\text{H}$ ppm ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)		DEPT	HMBC
1	29.8*	1.31(3H, s)	$\text{CH}_3$	29.7(C-9) 70.7(C-2) 142.5(C-3)	
2	70.7		C		
3	142.5	5.70(1H, m)	CH	29.7(C-9) 29.8(C-1) 45.0(C-5) 70.7(C-2), 121.7(C-4)	
4	121.7	5.63(1H, m)	CH	45.0(C-5) 70.7(C-2) 142.5(C-3)	
5	45.0	2.26(2H, m)	$\text{CH}_2$	27.4(C-10) 72.8(C-6) 121.7(C-4) 142.5(C-3), 144.8(C-7)	
6	72.8		C		
7	144.8	5.93(1H, dd, $J=17.3, 10.8$ Hz)	CH	27.4(C-10) 45.0(C-5) 72.8(C-6)	
8	112.0		$\text{CH}_2$		
		5.06( $1\text{H}_a$ , dd, $J=10.7, 1.2$ Hz)		72.8(C-6)	
		5.21( $1\text{H}_b$ , dd, $J=17.3, 1.2$ Hz)		72.8(C-6)	
				144.8(C-7)	
9	29.7*	1.31(3H, s)	$\text{CH}_3$	29.8(C-1) 70.7(C-2)	
10	27.4	1.28(3H, s)	$\text{CH}_3$	45.0(C-5) 72.8(C-6)	

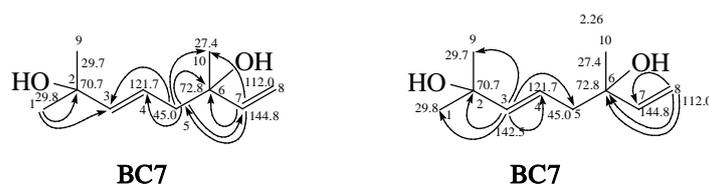
2-OH 2.40(1H, *bs*)8-OH 2.40(1H, *bs*)

\*Signals are interchangeable.



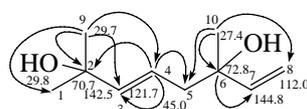
BC7

ภาพที่ 4.9 BC7-1 HMQC carbon-proton correlation ของสาร BC7 (ใช้ด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )



BC7

BC7

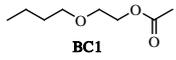


BC7

ภาพที่ 4.10 BC7- 2 HMBC carbon-proton correlation ของสาร BC7 (ใช้ด้วยลูกศรระหว่าง  $^1\text{H}$  ไปยัง  $^{13}\text{C}$ )

เมื่อนำสารสกัดเอทิลเอซีเตดของดอกจิวและ BC1 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น anticancer (KB และ BC cell lines) activity antifungal (*Candida albicans*) activity antimalarial (*Plasmodium falciparum*) activity anti lung cancer activity antituberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) activity และอื่นๆ พบว่า BC1 มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดได้ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีจากจิวป่าดอกขาว

		<b>BC-1</b> ดอกจิวป่า <i>Bombax anceps</i>	<b>BC1</b>  BC1	หมายเหตุ
1	KB, IC <sub>50</sub>                     	inactive	inactive	inactive
2	BC, IC <sub>50</sub>                     	41.44 active	inactive	inactive
3	NCI-H187, IC <sub>50</sub>                     	inactive	active	inactive
4	Antimalaria, IC <sub>50</sub>                     	inactive	inactive	inactive
5	TB. MIC                     	inactive	inactive	inactive
6	Anti- <i>C. albicans</i>                     	inactive	inactive	inactive
7	Anti- <i>M. grisca</i>	inactive	inactive	inactive
8	Anti- <i>B. cereus</i>	inactive	inactive	inactive
9	Anti- <i>E. coll</i>	inactive	inactive	inactive
10	Anti- <i>S. aureus</i>	inactive	inactive	inactive

เมื่อนำสารสกัดเมทานอลของจิวดอกขาวและใบจิวดอกขาวมาแยกโดย GC-MS พบว่าในจิวดอกขาวมีสาร cycacin 32.16% และกรด quinic 14.86% ในใบจิวดอกขาวพบสารphytol 54.09% กรดปาล์มมีติก 18.39%และกรดquinic 13.14% และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ Vero cells(African green monkey kidney) พบว่าสารสกัดของจิวดอกขาวและใบจิวดอกขาวไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

#### 4. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดดอกจิวและใบจิวในเมทานอล

ก. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดดอกจิวและใบจิวในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclo oxygenase 2 ( COX – 2 ) โดยทดสอบที่ 3 ความเข้มข้นของสารสกัดคือ 1, 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  เหตุที่เลือกทดสอบเฉพาะ COX – 2 ไม่ทดสอบ COX – 1 ด้วยเพราะ COX – 1 เป็นเอนไซม์หลักที่มีประโยชน์ต่อร่างกายพบได้ในเนื้อเยื่อโดยทั่วไป มีหน้าที่ในการรักษาการทำงานของระบบในร่างกายให้เป็นปกติ ในทางตรงกันข้าม COX – 2 เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องหรือตอบสนองต่อหรือจะทำงานเมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้นที่บริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย จึงมีความจำเพาะเจาะจง (specific ) กว่า COX – 1 ยิ่งกว่านั้นในปัจจุบันการผลิตยาตัวใหม่ให้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ COX ตัวใดตัวหนึ่งก็เน้นยาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX – 2 เท่านั้น ทั้งนี้เพื่อลดการ

เกิดผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการหลายอย่างไม่ให้เกิดขึ้น ในการทดลองนี้ได้ใช้สารสกัดดอกงิ้วที่ผ่านการสกัดด้วยเอทิลเอซีเตทมาแล้วมาสกัดด้วยเมทานอล ได้สารสกัดดอกงิ้วในเมทานอล ส่วนใบงิ้วใช้ใบงิ้วแห้งที่บดละเอียดมาสกัดด้วยเมทานอลได้สารสกัดใบงิ้วในเมทานอล

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดดอกงิ้วในเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 – 50  $\mu\text{g/ml}$  ไม่ยับยั้งการทำงานของ COX – 2 แต่ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งการทำงานของ COX – 2 ได้ โดยมี % inhibition เท่ากับ 23 % และมีค่า  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$  ส่วนสารสกัดใบงิ้วในเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 – 100  $\mu\text{g/ml}$  ยับยั้งการทำงานของ COX – 2 ได้น้อยกว่าสารสกัดดอกงิ้ว เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดียวกันคือ 100  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดใบงิ้วยับยั้งการทำงานของ COX – 2 ได้ โดยมี % inhibition เพียง 4 %

ข. การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ในการกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมโครฟาจ (Macrophage) ที่กระตุ้นจาก U 937 ด้วย PMA และ LPS โดยทดสอบที่ 3 ความเข้มข้นคือ 1, 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  โดยหน่วยของ iNOS แสดงเป็นปริมาณ iNOS พิโคกรัม ในปริมาณโปรตีน 50  $\mu\text{g}$  ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดระดับของปริมาณเอนไซม์ iNOS ลงได้เหลือ  $2.29 \pm 0.14$ ,  $0.98 \pm 0.23$  และ  $0.53 \pm 0.12 \text{ pg/50 } \mu\text{g}$  โปรตีนตามลำดับ ส่วนสารสกัดเมทานอลของใบงิ้วที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดระดับของปริมาณเอนไซม์ iNOS ลงได้เหลือ  $2.19 \pm 0.43$ ,  $2.16 \pm 0.26$  และ  $1.88 \pm 0.11 \text{ pg/50 } \mu\text{g}$  โปรตีน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ระหว่างสารสกัดดอกงิ้วและใบงิ้วที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารสกัดดอกงิ้วจะลดปริมาณ iNOS ได้ดีกว่าสารสกัดใบงิ้ว

ค. ผลการทดสอบ หลังจากฉีดสารเหนียวน้ำ (1% carrageenan) ให้เกิดการอักเสบและบวมแบบเฉียบพลัน ที่อุ้งเท้าข้างซ้ายของหนูทุกกลุ่ม และวัดความเปลี่ยนแปลงปริมาตรของอุ้งเท้าหนูที่เวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง พบว่าหนูกลุ่มควบคุมมีการบวมของอุ้งเท้าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารแวนิลอยมาตรฐาน Phenylbutazone ขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีการบวมของอุ้งเท้าหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับผลของสารสกัดงิ้วดอกขาวขนาด 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลทำให้การบวมของอุ้งเท้าหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชั่วโมงที่ 3 (น้อยกว่า 40%) แต่ในขณะที่สารสกัดงิ้วดอกขาว ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีผลทำให้การบวมของอุ้งเท้าหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่ามากกว่า 40% ในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 3