

บทที่ 3

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การเก็บใบลำดวนดอย

จัดทำ Voucher specimen และจำแนกพืชชนิดหนึ่งโดยการเทียบกับพืชตัวอย่างมาตรฐานซึ่งเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. การแยกสารบริสุทธิ์จากใบของลำดวนดอย

2.1 สารบริสุทธิ์จากชั้นเฮกเซนของใบ

ได้แก่ MHL-1 (32.4 มิลลิกรัม), MHL-2 (80.6 มิลลิกรัม) และ MHL-3 (93.0 มิลลิกรัม)

2.2 สารบริสุทธิ์จากชั้นไดคลอโรมีเทนของใบ

ได้แก่ MDL1 (15 มิลลิกรัม) และ MDL2 (22.5 มิลลิกรัม)

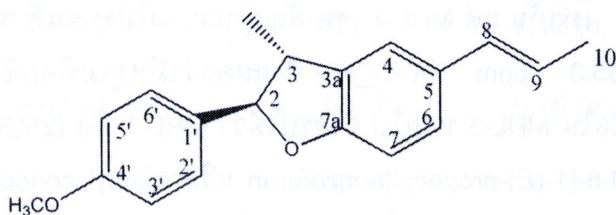
2.3 สารบริสุทธิ์จากชั้นเอทิลอะซิเตตของใบ

ได้แก่ MEL-1 (10.6 มิลลิกรัม)

3. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากสารสกัด

3.1 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชั้นเฮกเซนของใบ

3.1.1 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของ MHL-1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ MHL-1

MHL-1 มีลักษณะเป็นผลึกใส ไม่มีสี ใน HRESI-MS พบไอออน $[M+Na]^+$ ที่ m/z เท่ากับ 303.1295 ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{20}O_2$

สำหรับ ^1H NMR (ตารางที่ 1) พบโปรตอนบนวงแหวนเบนซีน 7 ตัวและโปรตอนบนพันธะคู่ 2 ตัว และจาก ^{13}C NMR (ตารางที่ 1) และ DEPT-135 พบ C 5 ตัว CH 11 ตัว และหมู่ CH_3 3 หมู่ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์แบบ COSY ระหว่าง H-3 (3.39 ppm) ซึ่งมีลักษณะเป็น quintet กับ oxymethine proton (H-2, 5.08 ppm) และกับ CH_3 -3 ที่ 1.38 ppm ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้นี้ และข้อมูลที่มีรายงานมาก่อน (Agrawal and Thakur, 1985; Achenbach et al., 1987) ทำให้ระบุได้ว่า MHL-1 เป็นอนุพันธ์ของ dihydrobenzofuran neolignan

บน dihydrobenzofuran ring โปรตอนที่ตำแหน่ง 6 และ 7 ซึ่งมีการคู่ควบแบบ *ortho* (จากค่า $J=8.2$ Hz) พบลักษณะสัญญาณเป็น doublet ที่ 7.12 และ 6.76 ppm ตามลำดับ ในขณะที่ สัญญาณ singlet ที่ 7.10 ppm เป็นของ H-4 ส่วนการคู่ควบระหว่าง H-8 (*dd*, $J= 15.7, 1.5$ Hz), H-9 (*dq*, $J= 15.7, 6.4$ Hz) และ CH_3 -10 (*dd*, $J= 6.4, 1.5$ Hz) เป็นของหมู่ vinyl โดยที่ค่าคงที่การคู่ควบระหว่าง H-8 และ H-9 เท่ากับ 15.7 Hz ซึ่งแสดงลักษณะ *trans* configuration ของพันธะคู่ ส่วนหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 3 (CH_3 -3) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากการคู่ควบกับ H-3 ในขณะที่ H-3 มีลักษณะเป็น quintet เนื่องจากการคู่ควบกับ CH_3 -3 และ H-2 และจากการที่ค่าคงที่การคู่ควบระหว่าง H-2 และ H-3 เท่ากับ 7.4 Hz ซึ่งแสดงว่าหมู่เมทิลบน C-3 อยู่ในตำแหน่งที่ตรงกันข้ามกับหมู่ฟีนิลบน C-2 นอกจากนี้ค่า $[\alpha]_D^{25}$ เท่ากับ +129.43 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน (Achenbach et al., 1987) ทำให้สรุปได้ว่า absolute configurations ที่ C-2 และ C-3 คือ 2*R* และ 3*R*

บริเวณ downfield ของ ^1H NMR พบ doublet 2 คู่ที่สมมาตรกันซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *p*-substituted benzene ring ที่มีโปรตอนซึ่งมีการคู่ควบแบบ *ortho* อยู่ 2 คู่ (จากค่า $J=8.7$ Hz) ที่ 7.34 ppm ซึ่งเป็นของ H-2'/H-6' และที่ 6.9 ppm ซึ่งเป็นของ H-3'/H-5'

เนื่องจากลักษณะ ^1H และ ^{13}C NMR ของ MHL-1 และ MHL-3 มีความคล้ายคลึงกัน มีจำนวน aromatic proton เท่ากัน แต่ MHL-1 พบสัญญาณของโปรตอนที่ 3.80 ppm (3H) และสัญญาณของคาร์บอนที่ 55.3 ppm ($4'\text{-OCH}_3$) ซึ่งแสดงว่ามีหมู่เมทอกซิลเพิ่มขึ้นมาในขณะที่สัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิลใน MHL-3 หายไป จึงสรุปได้ว่า MHL-1 คือ (2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-2-(4'-methoxyphenyl)-3-methyl-5-[1-(*E*)-propenyl]benzofuran หรือ methyl conocarpan ซึ่งเป็นการพบในพืชเป็นครั้งแรก โดยเคยมีรายงานการกึ่งสังเคราะห์จาก conocarpan ในลักษณะ 2*R*,3*R* configuration (Achenbach et al., 1991) และพบ 2*S*,3*S* configuration ใน *Milium mollis* เมื่อเร็วๆ นี้ (Sawasdee et al., 2010) โดยสเปกตรัมของ NMR ของทั้ง 2 configuration มีลักษณะเหมือนกัน แต่คุณสมบัติทางกายภาพต่างกัน เช่น 2*R*,3*R* เป็นผลึกที่ไม่ละลายใน DMSO ในขณะที่ 2*S*,3*S* มีลักษณะเป็นน้ำมัน ค่า $[\alpha]_D^{25}$ ของ 2*R*,3*R* เป็น dextrorotatory ส่วน 2*S*,3*S* เป็น levorotatory

ตารางที่ 1 ^1H และ ^{13}C chemical shift (ppm) ของ methyl conocarpan (CDCl_3) (Achenbach et al., 1991) และ MHL-1 (CDCl_3 , 300 MHz)

Position	methyl conocarpan		MHL-1	
	^1H (multiplicity, coupling constant(Hz))	^{13}C	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C
1				
2	5.10 (<i>d</i> , 9.0)	93.2	5.08 (<i>d</i> , 7.4)	92.7
3	3.36 (<i>m</i>)	46.0	3.39 (<i>quintet</i> , 7.4)	45.2
3-CH ₃	1.39 (<i>d</i> , 7.0)	18.4 ^a	1.38 (<i>d</i> , 7.0)	17.8
3a		132.1; 133.5; 133.9 ^b		132.7
4	7.0-7.2 (<i>m</i>)	121.8	7.10 (<i>s</i>)	120.7
5		132.1; 133.5; 133.9 ^b		131.2
6	7.0-7.2 (<i>m</i>)	127.1	7.12 (<i>d</i> , 8.2)	126.3
7	6.69 (<i>d</i> , 8.0)-	109.7	6.76 (<i>d</i> , 8.2)	109.3
7a		159.4, 160.7 ^c		159.7
8	6.35 (<i>dm</i> , 16.0)	131.9	6.36 (<i>dd</i> , 15.7, 1.5)	130.8
9	5.9-6.2 (<i>m</i>)	123.1	6.09 (<i>dq</i> , 15.7, 6.4)	122.9
10	1.82 (<i>br d</i> , 5.0)	18.2 ^a	1.85 (<i>dd</i> , 6.4, 1.5)	18.4

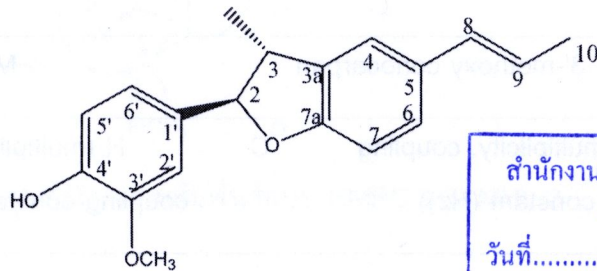
ตารางที่ 1 ^1H และ ^{13}C chemical shift (ppm) ของ methyl conocarpan (CDCl_3) (Achenbach et al., 1991) และ MHL-1 (CDCl_3 , 300 MHz) (ต่อ)

Position	methyl conocarpan		MHL-1	
	^1H (multiplicity, coupling constant(Hz))	^{13}C	^1H (multiplicity, coupling constant(Hz))	^{13}C
1'		132.1; 133.5; 133.9 ^b		132.4
2'	7.38	128.4	7.34 (d, 8.7)	127.6
3'	6.95	114.8	6.90 (d, 8.7)	114.0
4'		159.4, 160.7 ^c		158.3
5'	6.95	114.8	6.90 (d, 8.7)	114.0
6'	7.38	128.4	7.34 (d, 8.7)	127.6
4'-OCH ₃	3.81 (s)	55.6	3.80 (s)	55.3

a, b, c interchangeable assignments



3.1.2 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของ MHL-2



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดวิจัย
วันที่ 7 S.A. 2555
เลขทะเบียน 190923
เลขเรียกหนังสือ

รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ MHL-2

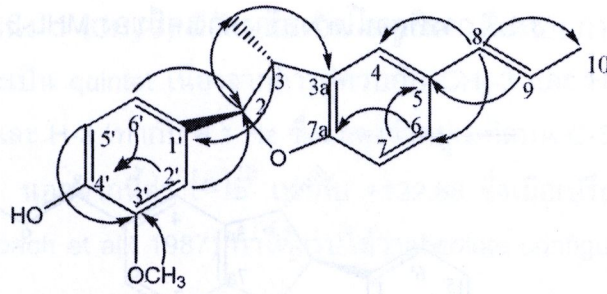
MHL-2 มีลักษณะเป็นผงสีขาว ใน HRESI-MS พบไอออน $[M+Na]^+$ ที่ m/z เท่ากับ 319.1264 ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{20}O_3$ และพบหมู่ OH บนสเปกตรัมของ IR ที่ absorption band 3382 cm^{-1}

เนื่องจาก ^1H และ ^{13}C NMR ของ MHL-2 (ตารางที่ 2) มีความคล้ายคลึงกับ MHL-1 และ MHL-3 แสดงว่า MHL-2 เป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่ม dihydrobenzofuran เช่นกัน โดยบ่งชี้การคู่ควบแบบ *ortho* ระหว่าง H-5' and H-6' ($J = 6.0\text{ Hz}$) และพบสัญญาณ broad singlet ที่ 6.90 ppm ของ H-2' ซึ่งอยู่ในตำแหน่ง *meta* กับ H-6' นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ singlet ที่ 3.86 (3H) ppm และที่ 55.9 (3'-OCH₃) ซึ่งแสดงถึงการมีหมู่เมทิลในโครงสร้าง และความสัมพันธ์แบบ HMBC (รูปที่ 3 และตารางที่ 3) ระหว่าง C-3' (146.8 ppm) กับ H-5' และ 3'-OCH₃ ช่วยระบุการแทนที่ของหมู่เมทิลที่บน C-3' ดังนั้นหมู่ OH ที่พบใน IR จึงอยู่บน C-4' ความสัมพันธ์แบบ HMBC ระหว่าง H-2 กับ C-2' และ C-6' ช่วยในการยืนยันตำแหน่งของ dihydrobenzofuran บน C-1' ของวงแหวนเบนซีน

จากข้อมูลดังกล่าวและการเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ ทำให้สรุปได้ว่า MHL-2 คือ (2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-2-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3-methyl-5-[1-(*E*)-propenyl]benzofuran หรือ 3'-methoxy conocarpan (Achenbach et al., 1987) สารตัวนี้เคยมีการพบใน *Krameria cytisoides* Cav. (Achenbach et al., 1987), *Piper regnellii* (Miq.) C.CD. (Benevides et al., 1999), และ *Miliusa mollis* Pierre var. *sparsior* Caib (Sawasdee et al., 2010)

ตารางที่ 2 ^1H และ ^{13}C chemical shift (ppm) ของ 3'-methoxy conocarpan (CDCl_3) (Achenbach et al., 1987) และ MHL-2 (CDCl_3 , 300 MHz)

Position	3'-methoxy conocarpan		MHL-2	
	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C
1				
2	5.08 (<i>d</i> , 9.3)	93.0	5.06 (<i>d</i> , 8.4)	93.1
3	3.35 (<i>m</i>)	45.2	3.40 (<i>quintet</i> , 8.4)	45.3
3-CH ₃	1.37 (<i>d</i> , 7.1)	17.8	1.39 (<i>d</i> , 6.6)	17.6
3a		132.5		132.4
4	7.09 (<i>d</i> , 2.0)	120.7	7.14 (<i>s</i>)	120.7
5		131.4		131.3
6	6.84 (<i>d</i> , 8.5)	126.2	7.12 (<i>d</i> , 8.1)	126.3
7	6.91 (<i>dd</i> , 8.5, 2.0)	109.2	6.77 (<i>d</i> , 8.1)	109.3
7a		158.3		158.3
8	6.38 (<i>dd</i> , 15.7, 2.0)	130.9	6.37 (<i>dd</i> , 15.8, 1.4)	130.8
9	6.10 (<i>dq</i> , 15.7, 6.4)	122.9	6.09 (<i>dq</i> , 15.8, 6.5)	123.1
10	1.83 (<i>dd</i> , 6.4, 2.0)	18.2	1.86 (<i>dd</i> , 6.5, 1.4)	18.4
1'		132.3		132.4
2'	6.70 (<i>d</i> , 8.3)	108.7	6.90 (<i>br s</i>)	108.6
3'		146.8		146.8
4'		145.8		145.8
5'	7.13 (<i>dd</i> , 8.3, 1.5)	114.3	6.92 (<i>d</i> , 6.0)	114.0
6'	7.24 (<i>s</i>)	119.5	6.95 (<i>d</i> , 6.0)	119.7
3'-OCH ₃	3.85(<i>s</i>)	55.9	3.86 (<i>s</i>)	55.9

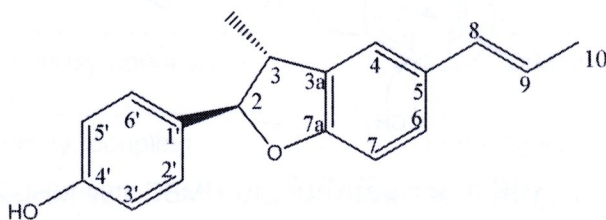


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์แบบ HMBC ของ MHL-2

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์แบบ HMBC ของ MHL-2 (CDCl₃, 300 MHz)

Position	¹ H	HMBC
2	5.06	3-CH ₃ , C-2', C-6'
3	3.40	C-1'
3-CH ₃	1.39	C-2, C-3a
4	7.14	C-7a, C-8
6	7.12	C-7a
7	6.77	C-5
8	6.37	C-4, C-6, C-10
9	6.09	C-5
10	1.86	C-8
2'	6.90	C-2, C-4'
5'	6.92	C-1', C-3'
6'	6.95	C-2, C-4'
3'-OCH ₃	3.86	C-3'

3.1.3 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของ MHL-3



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ MHL-3

สาร MHL-3 มีลักษณะเป็นผลึกแบนใส ใน HRESI-MS พบไอออน $[M+Na]^+$ ที่ m/z 289.1130 ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}O_2$ บนสเปกตรัมของ IR พบหมู่ OH ที่ 3374 cm^{-1}

สำหรับ $^1\text{H NMR}$ (ตารางที่ 4) พบโปรตอนบนวงแหวนเบนซีน 7 ตัวและโปรตอนบนพันธะคู่ 2 ตัว และจาก $^{13}\text{C NMR}$ (ตารางที่ 4) และ DEPT-135 พบ C 5 ตัว CH 11 ตัว และหมู่ CH_3 2 หมู่ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์แบบ COSY ระหว่างโปรตอนที่ตำแหน่ง 3.38 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น quintet กับ oxymethine proton ที่ตำแหน่ง 5.07 ppm และกับโปรตอนบนหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 1.37 ppm ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้นี้และข้อมูลที่มีรายงานมาก่อน (Agrawal and Thakur, 1985; Achenbach et al., 1987) ทำให้ระบุได้ว่า MHL-3 เป็นอนุพันธ์ของ dihydrobenzofuran neolignan

บน dihydrobenzofuran ring โปรตอนที่ตำแหน่ง 6 และ 7 ซึ่งมีการคู่ควบแบบ *ortho* (จากค่า $J=7.9\text{ Hz}$) พบลักษณะสัญญาณเป็น doublet ที่ตำแหน่ง 7.11 และ 6.78 ppm ตามลำดับ ในขณะที่ singlet ที่ตำแหน่ง 7.10 ppm เป็นของตำแหน่งที่ 4 ส่วนการคู่ควบระหว่าง H-8 (dd , $J= 15.6, 1.5\text{ Hz}$), H-9 (dq , $J= 15.6, 6.6\text{ Hz}$) และ CH_3 -10 (dd , $J= 6.6, 1.5\text{ Hz}$) เป็นของหมู่ vinyl โดยที่ค่าคงที่การคู่ควบระหว่าง H-8 และ H-9 เท่ากับ 15.6 Hz ซึ่งแสดงลักษณะ *trans* configuration ของพันธะคู่ นอกจากนี้ใน HMBC (รูปที่ 5 และตารางที่ 5) พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-8 กับ C-4 และ C-6 และระหว่าง H-9 กับ C-5 ซึ่งช่วยในการยืนยันการแทนที่ของหมู่ vinyl ที่ตำแหน่ง 5 ของ dihydrobenzofuran ring

บริเวณ downfield ของ $^1\text{H NMR}$ พบ doublet 2 คู่ที่สมมาตรกันซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *p*-substituted benzene ring ที่มีโปรตอนซึ่งมีการคู่ควบแบบ *ortho* (จากค่า $J=7.6\text{ Hz}$) อยู่ 2 คู่ ที่ตำแหน่ง 7.25 ppm ซึ่งเป็นของ H-2'/H-6' และที่ตำแหน่ง 6.25 ppm ซึ่งเป็นของ H-3'/H-5' นอกจากนี้ใน HMBC ยังพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-2' และ H-6' กับ C-2 และ H-2 กับ C-2' และ C-6' ซึ่งยืนยันการแทนที่ของวงแหวนเบนซีนนี้ที่ตำแหน่ง 2 ของ dihydrobenzofuran ring

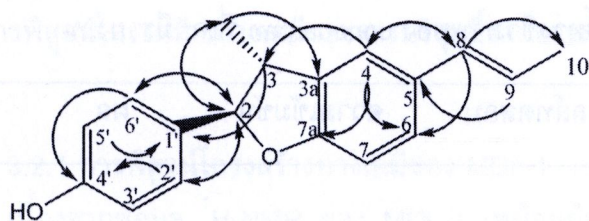
หมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 3 (CH_3 -3) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากการคู่ควบกับ H-3 ด้วยกัน ในขณะที่ H-3 มีลักษณะเป็น quintet เนื่องจากการคู่ควบกับ CH_3 -3 และ H-2 และจากการที่ค่าคงที่การคู่ควบระหว่าง H-2 และ H-3 เท่ากับ 8.1 Hz ซึ่งแสดงว่าหมู่เมทิลบน C-3 อยู่ในตำแหน่งที่ตรงกันข้ามกับหมู่ฟีนิลบน C-2 นอกจากนี้ค่า $[\alpha]_D^{25}$ เท่ากับ +122.68 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน (Achenbach et al., 1987) ทำให้สรุปได้ว่า absolute configurations ที่ C-2 และ C-3 คือ 2R และ 3R

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถพิสูจน์โครงสร้างของ MHL-3 ว่าเป็น conocarpan หรือ (2R,3R)-2,3-dihydro-2-(4'-hydroxyphenyl)-3-methyl-5-[1-(E)-propenyl]benzofuran สารตัวนี้เคยมีรายงานว่าพบในพืชต่อไปนี้ เช่น *Krameria cystisoides* Cav. (Krameriaceae) (Seo et al., 2004), *Piper solmsianum* C.DC (Kato and Furlan, 2007), *Piper regnellii* C.DC. (Piperaceae) (Luize et al., 2006), และ *Milusa mollis* Pierre (Annonaceae) (Sawasdee et al., 2010) โดยรายงานการพบ conocarpan จากต้นลำดวนดอยนี้เป็นการพบใน genus *Mitrephora* เป็นครั้งแรก นอกจากนี้ยังพบรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น antibacterial, antifungal, และ antiprotozoal (ตารางที่ 6) (Luize et al., 2006).



ตารางที่ 4 ^1H และ ^{13}C chemical shift (ppm) ของ conocarpan (CDCl_3) (Achenbach et al., 1987) และ MHL-3 (CDCl_3 , 300 MHz)

Position	Conocarpan		MHL-3	
	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C
1				
2	5.00 (<i>d</i> , 8.8)	93.1	5.07 (<i>d</i> , 8.1)	92.7
3	3.30 (<i>m</i>)	45.5	3.38 (<i>quintet</i> , 8.1)	45.1
3-CH ₃	1.28 (<i>d</i> , 6.8)	17.9	1.37 (<i>d</i> , 6.9)	17.8
3a		133.1		132.4
4	7.02 (<i>m</i>)	121.4	7.10 (<i>br s</i>)	120.8
5		131.6		131.3
6	7.02 (<i>m</i>)	126.7	7.11 (<i>d</i> , 7.9)	126.3
7		109.4	6.78 (<i>d</i> , 7.9)	109.3
7a		159.0		158.1
8	6.30 (<i>d</i> , 16)	131.6	6.36 (<i>dd</i> , 15.6, 1.5)	130.7
9	6.08 (<i>m</i>)	122.7	6.08 (<i>dq</i> , 15.6, 6.6)	123.1
10	1.78 (<i>d</i> , 5.0)	18.3	1.85 (<i>dd</i> , 6.6, 1.5)	18.4
1'		132.3		132.6
2'	7.27 (<i>d</i> , 8.5)	128.2	7.25 (<i>d</i> , 7.6)	127.9
3'	6.78 (<i>d</i> , 9)	115.9	6.75 (<i>d</i> , 7.6)	115.5
4'		157.8		155.7
5'	6.78 (<i>d</i> , 9)	115.9	6.75 (<i>d</i> , 7.6)	115.5
6'	7.27 (<i>d</i> , 8.5)	128.2	7.25 (<i>d</i> , 7.6)	127.9



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์แบบ HMBC ของ MHL-3

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์แบบ HMBC ของ MHL-3 (CDCl₃, 300 MHz)

Position	¹ H	HMBC
2	5.07	3- <u>C</u> H ₃ , C-2', C-6'
3	3.38	C-1'
3-CH ₃	1.37	C-2, C-3a
4	7.10	C-3, C-6, C-7a, C-8
6	7.11	C-4
7	6.75	C-3a, C-5
8	6.36	C-4, C-6, C-9, C-10
9	6.08	C-5, C-10
10	1.85	C-8, C-9
2', 6'	7.25	C-2, C-4'
3', 5'	6.78	C-1'

ฤทธิ์	เซลล์ทดสอบ	ความเข้มข้น	ผล	เอกสารอ้างอิง
Antibacterial				
agar plate	<i>Bacillus subtilis</i>	200 µg/disc		Arnone et al., 1988
	<i>Bacillus subtilis</i>		IC ₅₀ 0.19 mg/ml	Arnone et al., 1988
	<i>Escherichia coli</i>	200 µg/disc		Arnone et al., 1988
	<i>Escherichia coli</i>		MIC 0.19 mg/ml	Ahmad et al., 1998
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		IC ₅₀ 0.19 mg/ml	Ahmad et al., 1998
	<i>Staphylococcus aureus</i>		IC ₅₀ 0.38 mg/ml	Ahmad et al., 1998
Antifungal				
agar plate	<i>Aspergillus niger</i>	200 µg/disc		Arnone et al., 1988
	<i>Microsporium gypseum</i>		MIC 4.0 mg/ml	Freixa et al., 2001
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		MIC 8.0 mg/ml	Freixa et al., 2001
Antiyeast				
agar plate	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200 µg/disc		Arnone et al., 1988
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		MIC 16.0 mg/ml	Freixa et al., 2001
	<i>Candida albican</i>		MIC 8.0 mg/ml	Freixa et al., 2001
	<i>Cryptococcus neoformans</i>		MIC 16.0 mg/ml	Freixa et al., 2001
Insecticide				
	<i>Aedes atropalpus</i>	10.0 µg/ml		Chauret et al., 1996

3.2 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของใบ

3.2.1 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของ MDL-1

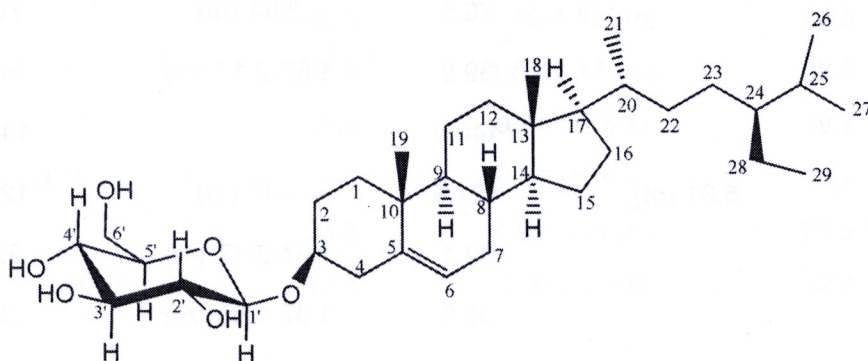
เนื่องจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของ MDL-1 เหมือนกับของ MHL-2 จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร MDL-1 คือ 3'-methoxy conocarpan

3.2.2 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของ MDL-2

เนื่องจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของ MDL-2 เหมือนกับของ MHL-3 จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร MDL-2 คือ conocarpan

3.3 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชั้นเอทิลอะซีเตตของใบ

3.3.1 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของ MEL-1



รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ MEL-1

MEL-1 มีลักษณะเป็นผงสีขาว เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางด้าน NMR (ตารางที่ 7) กับรายงานก่อนหน้า (Agrawal, 1992, Moghaddam et al., 2006, Rai et al., 2006) สามารถระบุได้ว่า MEL-1 คือ β -sitosterol-3-O- β -glucopyranoside โดยสัญญาณที่ 5.08 ppm ของ H-1' ซึ่งเป็น anomeric proton ที่มีค่าคงที่การคู่ควบกับ H-2 เท่ากับ 7.5 Hz และสัญญาณ downfield ของ anomeric carbons (C-1') ที่ 103.1 ppm แสดงถึง β -linkage ของ O-linkage ระหว่างกลูโคสกับ steroidal aglycone ตามลำดับ

ตัวอย่างของพืชที่พบ β -sitosterol-3-O-glucopyranoside เช่น *Pergularia tomentosa* L. (Asclepiadaceae) (Gohar et al., 2000), *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae) (Rahman et al., 2009) และ *Erythrina vogelii* Hook. (Fabaceae) (Ali et al., 2011)

ตารางที่ 7 ^1H และ ^{13}C NMR chemical shift (ppm) ของ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (pyridine- d_5) (Moghaddam et al., 2006; Rai et al., 2006) และ MEL-1 (pyridine- d_5 , 300 MHz)

Position	β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside		MEL-1	
	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C
Aglycone				
1		37.4	1.10-1.55 (m)	38.0
2		30.2	1.10-1.55 (m)	30.0
3		78.5	3.94 (m)	79.1
4		39.9	1.67-2.17 (m)	39.5
5		140.8		141.4
6	5.31 (m)	121.9	5.37 (m)	122.4
7		32.1	1.67-2.17 (m)	32.6
8		32.0	1.67-1.88 (m)	32.5
9		50.3	1.10-1.55 (m)	50.8
10		36.9		37.4
11		21.2	1.10-1.55 (m)	21.8
12		39.3	1.10-1.55 (m)	39.8
13		42.4		42.8
14		56.8	1.10-1.55 (m)	57.3
15		24.5	1.67-1.88 (m)	25.0
16		28.5	1.67-2.17 (m)	29.0
17		56.2	1.10-1.55 (m)	56.7
18	0.67 (s)	11.9	0.67 (s)	12.4
19	0.93 (s)	19.4	0.95 (s)	19.9
20		36.3	1.67-2.17 (m)	36.9

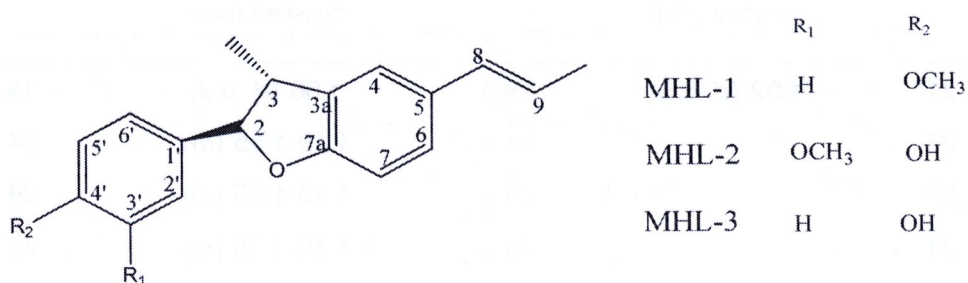
ตารางที่ 7 ^1H และ ^{13}C NMR chemical shift (ppm) ของ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (pyridine- d_5) (Moghaddam et al., 2006; Rai et al., 2006) และ MEL-1 (pyridine- d_5 , 300 MHz) (ต่อ)

Position	β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside		MEL-1	
	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C	^1H (multiplicity, coupling constant (Hz))	^{13}C
21	1.02 (<i>d</i> , 6.5)	19.0	1.00 (<i>d</i> , 6.3)	19.5
22		34.1	1.10-1.55 (<i>m</i>)	34.7
23		26.3	1.10-1.55 (<i>m</i>)	26.9
24		46.0	1.10-1.55 (<i>m</i>)	46.5
25		29.4	1.67-2.17 (<i>m</i>)	29.8
26		19.2	0.91 (<i>d</i> , 6.4)	19.7
27	0.86 (<i>d</i> , 7.7)	20.0	0.88 (<i>d</i> , 6.4)	19.7
28		23.3	1.10-1.55 (<i>m</i>)	23.9
29	0.90 (<i>t</i> , 7.0)	12.1	0.90 (<i>t</i> , 6.4)	12.4
Sugar				
1'		102.5	5.08 (<i>d</i> , 7.5)	103.1
2'		75.2	4.09 (<i>t</i> , 7.5)	75.8
3'		78.4	4.34 (<i>m</i>)	78.9
4'		71.6	4.34 (<i>m</i>)	72.2
5'		78.0	3.99 (<i>m</i>)	78.6
6'		62.8	A 4.60 (<i>br d</i> , 11.4) B 4.44 (<i>dd</i> , 11.4, 5.7)	63.3



4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบของลำตวนดอย

สารบริสุทธิ์ 3 ตัวที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารในกลุ่ม neolignan ได้แก่ MHL-1 ((2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-2-(4'-methoxyphenyl)-3-methyl-5-[1-(*E*)-propenyl]benzofuran หรือ methyl conocarpan), MHL-2 ((2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-2-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3-methyl-5-[1-(*E*)-propenyl]benzofuran หรือ 3'-methoxy conocarpan) และ MHL-3 ((2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-2-(4'-hydroxyphenyl)-3-methyl-5-[1-(*E*)-propenyl]benzofuran หรือ conocarpan) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีดังนี้



ตารางที่ 8 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์จากใบลำตวนดอย

สารบริสุทธิ์	Brine shrimp lethality (IC ₅₀ µg/ml)	HFI assay (mm)	MTT assay (IC ₅₀ µg/ml)		
			HeLa	HepG2	U937
MHL-1	157.90	0	ND	ND	ND
MHL-2	148.79	11 (BZI)	11.0	18.8	5.9
MHL-3	6.21	21 (CZI)	13.7	18.6	6.3

ND = ไม่สามารถหาค่าได้

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้ง 3 ตัว โดยในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นด้วย brine shrimp lethality และ HFI assay พบว่า conocarpan แสดงความเป็นพิษต่อไรทะเลสูงที่สุด (IC₅₀ = 6.21 µg/ml) และยับยั้งการสร้างไฮฟาด้วย CZI = 21 mm ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ *Streptomyces* 85E ส่วน 3'-methoxy conocarpan ยับยั้งการสร้างไฮฟาด้วย BZI = 11

mm ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ protein kinase และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดด้วย MTT assay พบว่าค่า IC_{50} ของ conocarpan ใน HeLa, HepG2 และ U937 เท่ากับ 13.7, 18.6 และ 6.3 $\mu\text{g/ml}$ และของ 3'-methoxy conocarpan เท่ากับ 11.0, 18.8 และ 5.9 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพกับโครงสร้างทางเคมีพบว่า การแทนที่ด้วยหมู่เมทิลที่ออกซิเจนที่ตำแหน่ง 4' ของ methyl conocarpan หรือตำแหน่ง 3' ของ 3'-methoxy conocarpan ทำให้ความเป็นพิษต่อโรหะเลของสารทั้ง 2 ตัวลดลงอย่างมาก อาจเนื่องมาจากการแทนที่ด้วยหมู่เมทิลที่ออกซิเจนทำให้การละลายน้ำของสารลดลง ในขณะที่การแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 4' เช่นใน conocarpan ทำให้ความเป็นพิษต่อโรหะเลและการยับยั้งการสร้างไฮฟาเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ neolignans ทั้ง 3 ตัวยังไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ คือ normal human lung fibroblast cells (MRC5) ซึ่งแสดงว่า conocarpan และ 3'-methoxy conocarpan มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง

1. *Содержание*
 2. *Введение*
 3. *Основы теории*
 4. *Методика исследования*
 5. *Результаты и их обсуждение*
 6. *Заключение*
 7. *Список литературы*
 8. *Приложение*

9. *Содержание*
 10. *Введение*
 11. *Основы теории*
 12. *Методика исследования*
 13. *Результаты и их обсуждение*
 14. *Заключение*
 15. *Список литературы*
 16. *Приложение*

17. *Содержание*
 18. *Введение*
 19. *Основы теории*
 20. *Методика исследования*
 21. *Результаты и их обсуждение*
 22. *Заключение*
 23. *Список литературы*
 24. *Приложение*

25. *Содержание*
 26. *Введение*
 27. *Основы теории*
 28. *Методика исследования*
 29. *Результаты и их обсуждение*
 30. *Заключение*
 31. *Список литературы*
 32. *Приложение*

33. *Содержание*
 34. *Введение*
 35. *Основы теории*
 36. *Методика исследования*
 37. *Результаты и их обсуждение*
 38. *Заключение*
 39. *Список литературы*
 40. *Приложение*