

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกรากต้นกันเกรา

(*Fagraea fragrans* Roxb.)

Isolation and Identification of Bioactive Chemical Constituents of The Root

Bark of *Fagraea fragrans* Roxb.

สำเนียง อภิสันติยาภคม

Samneang Apisantiyakom

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ถ.พหลโยธิน กม.48 ประตูน้ำพระอินทร์ จ.ปทุมธานี 13180

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกกรากต้นกันเกรา (*Fagraea fragrans* Roxb.) สามารถแยกสารที่มีการรายงานแล้ว 2 ชนิด ได้แก่ ไพนอร์ซินอล (I) และ นัวคลิดอล (II) และพบว่าสาร I มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (สายพันธุ์เค-1) ด้วยค่าไอซี₅₀ เท่ากับ 3.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* ในระดับอ่อน ด้วยค่าเอ็มไอซีเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร II มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด ค่าไอซี₅₀ เท่ากับ 18.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคอย่างอ่อน (ค่าเอ็มไอซีเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งเต้านม และไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เค 1 (ที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

คำสำคัญ : กันเกรา ไพนอร์ซินอล นัวคลิดอล เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เค-1

Abstract

Isolation and identification of bioactive chemical constituents of the root bark of *Fagraea fragrans* Roxb., two known compounds, pinoresinol (I) and naucleal (II), Compound I possesses antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* (K1 strain) with IC₅₀ value of 3.4 µg/mL, and antitubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) with MIC value of 200 µg/mL Compound II

exhibits cytotoxicity toward NCI-H187 cell line IC_{50} value of 18.94 $\mu\text{g/mL}$ and also demonstrate mild anti-tubercular activity ($MIC = 200 \mu\text{g/mL}$). However, compound **II** is inactive towards KB and BC cell lines, and also inactive against K1 malarial parasite strain (at 20 $\mu\text{g/mL}$).

Keywords : *Fagraea fragrans* Roxb., Pinoresinol, naucleol, *Plasmodium falciparum* (K1 strain)

1. บทนำ

ต้นก้นกรามีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Fagraea fragrans* Roxb. อยู่ในจีนัส *Fagraea* วงศ์ Potaliaceae [1] เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่อาจมีความสูงถึง 100 ฟุต ใบมีสีเขียวอ่อนลักษณะเป็นรูปหอก ดอกมีกลิ่นหอม เมื่อแรกผลจะมีสีครีมจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแก่ ผลมีลักษณะกลมเป็นชนิดเบอร์รี่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม ภายในผลมีเม็ดเล็กๆจำนวนมาก พืชชนิดนี้ขึ้นอยู่ทั่วไปในดินแดนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แถบแหลมมาลาญ เช่น สิงคโปร์ และมาเลเซีย มีชื่อเรียกว่า ตำมูซู (Tammusu) สำหรับประเทศไทยพบในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ได้แก่ ภาคกลางเรียกว่าก้นกรา ภาคใต้เรียกว่า ตำเสา ส่วนภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่า มั่นปลา ก้นกราเติบโตได้อย่างช้าๆในที่ลุ่มใกล้แหล่งน้ำและมีแสงแดดจัด แต่สามารถทนความแห้งแล้งได้ดี แม้แต่ในสภาพดินปนทราย ขนาดลำต้นเมื่อโตเต็มที่อาจมีความสูงถึง 100 ฟุต และมีอายุกว่า 100 ปีในประเทศไทยพบพืชจีนัส *Fagraea* เพียง 8 ชนิด ดังนี้ [2]

1. *F. acuminatissima* Merr.
2. *F. auriculata* Jack
3. *F. carnos*a Jack
4. *F. ceilanica* Thumb.
5. *F. crenulata* Maingar ex C. B. Clark
6. *F. fragrans* Roxb.
7. *F. racemosa* Jack
8. *F. tubulosa* Blume

สรรพคุณในการใช้เป็นยารักษาโรคในตำราแพทย์แผนไทยสมัยโบราณกล่าวว่า แก่นมีรสเฝื่อน ฝาด ขม เข้ายาบำรุงธาตุ แก้ไข้จับสั่น แก้หืด ไอ ริดสีดวง ท้องมาน ถ่ายเป็นมูกเลือด แก้พิษฝีดาษ บำรุงม้าม

แก้เลือดลมพิการ ใช้แก่นของลำต้นเป็นยาอายุวัฒนะ เปลือกบำรุงโลหิต ผิวหนังพุพอง ส่วนในมาเลเชียใช้ใบและก้านต้มน้ำกินแก้บิด และใช้เปลือกต้มน้ำแก้มาลาเรีย

ในปี พ.ศ. 2517 มีการทดสอบสรรพคุณในการรักษาโรคแผนปัจจุบันโดย Natarajan และคณะ [3] โดยทดสอบหา toxicity ของ gentianine ซึ่งสกัดได้จากใบของกันเกรา ผลปรากฏว่าไม่แสดงผลในทางต่อต้านเชื้อมาลาเรียชื่อ *Plasmodium berghei* และไม่เป็นผลกับเชื้อบิด *Entamoeba invadens* เช่นกัน แต่ใบกันเกราสามารถใช้ประโยชน์ทางยาได้ โดยการผสมทำทิงเจอร์ในยาพวก bitter tonic แทน gentian roots ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจากใบกันเกรามี glucoside ชื่อ Swertiamarin ที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับ gentian roots

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่รายงานว่าสิ่งสกัดจากแอลกอฮอล์ของลำต้นกันเกราสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Plasmodium falciparum* [4]

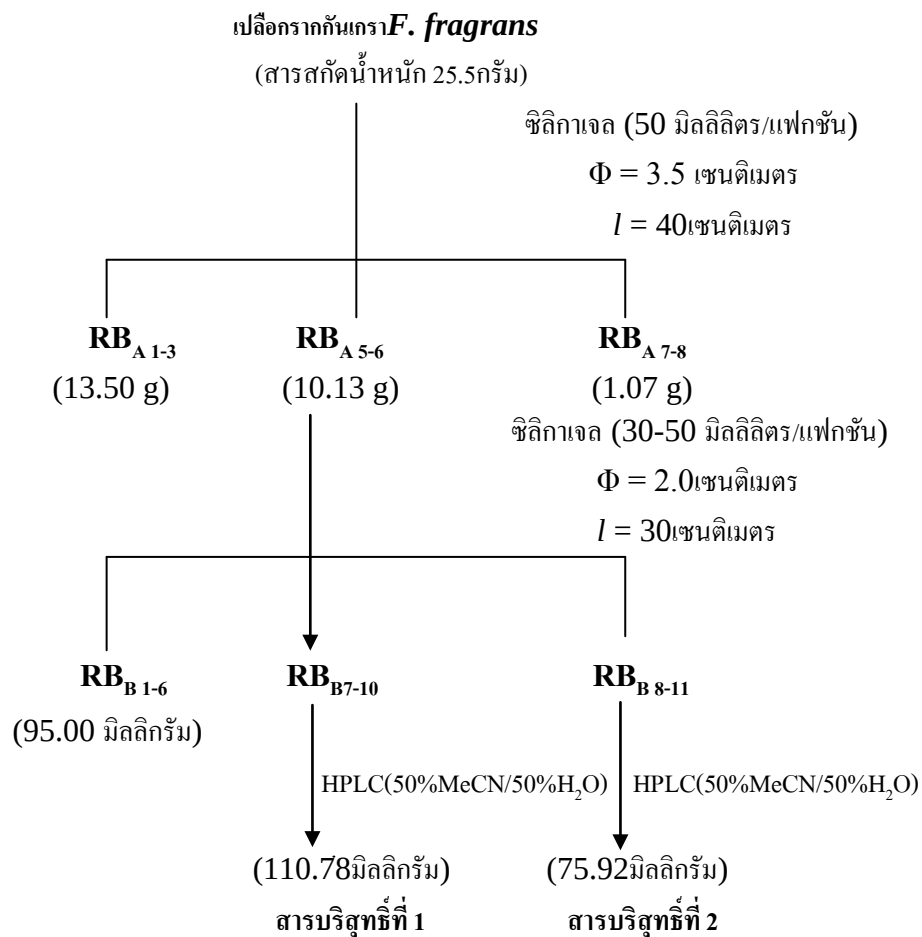
สำหรับข้อมูลทางพิษวิทยา ในปี พ.ศ. 2507 Wan และคณะ [5] สามารถสกัดแยกแอลคาลอยด์ชื่อ gentianine ได้จากใบและผลของกันเกราเป็นครั้งแรก

การทดสอบสิ่งสกัดจากเฮกเซนของเปลือกรากกันเกราโดยใช้ทีนเลเซอร์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มต่อเอทานอลในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นตัวพา พบจุดที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของสารที่แยกตัวออก ภายใต้อิทธิพลของความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แสดงให้ทราบว่ามีการผลิตพันธะธรรมชาติกลุ่มที่มีโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกที่น่าสนใจปรากฏอยู่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในพืชจีนัส *Fagraea* นี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นกันเกราซึ่งสามารถหาได้ไม่ยาก เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการดำเนินงานวิจัย และจากข้อมูลที่ได้รวบรวมแสดงให้เห็นว่าเปลือกรากกันเกรามีแนวโน้มที่จะมีสารบริสุทธิ์ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย

2. วิธีทดลอง

- 2.1 นำเปลือกรากกันเกรา น้ำหนักแห้ง 20 กิโลกรัม บดให้ละเอียด แฉในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 10 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองแยกกากออกและเก็บสารละลายไว้
- 2.2 นำสารสกัดจากตัวทำละลาย ในข้อ 2.1 มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศได้สารสกัดจาก ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน น้ำหนัก 23.5 กรัม
- 2.3 นำสารสกัดในข้อ 2.2 มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล 3385 (ของ Merck) โดยใช้เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล:ไดคลอโรมีเทน โดยมีอัตราส่วนต่อปริมาตร 50:50 (เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน) เป็นตัวพา

- 2.4 ดำเนินการตามข้อ 2.3 โดยการเก็บสารละลายซึ่งเป็นตัวพา ครั้งละ 30-50 มิลลิลิตรตามความเหมาะสม และ ระบายให้แห้ง จากนั้นตรวจสอบสารสกัดที่ได้ในแต่ละแฟกชันด้วยทีนเลเซอร์โครมาโทกราฟี (60 G F₂₅₄ ของ E. Merck) ตรวจสอบ UV สเปกตรัมโดยใช้ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 และ 366 นาโนเมตร (Camag UV-Cabinet)
- 2.5 นำแฟกชันที่มีแนวโน้มว่ามีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอยู่จากการตรวจสอบในข้อ 2.4 ไปตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลอีกครั้งด้วย ¹H- NMR spectral data (Bruker-DRX-400 spectrometer) เพื่อให้ทราบสูตรโครงสร้างของสารอย่างหายาว่าเป็นสารกลุ่มใด
- 2.6 จากการทดลองในข้อ 2.4 พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เมื่อดำเนินการทดลองตามแผนภาพที่ 1 และตรวจสอบด้วย ¹H- NMR spectral data แฟกชันที่ RB_{B7-10} และ RB_{B8-11} มีสเปกตรัมที่แสดงให้ทราบว่ามีการมีสูตรโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกปรากฏอยู่



แผนภาพที่ 1. ขั้นตอนการแยกสกัดสารประกอบที่ 1 และ 2 จากเปลือกกรากันเกรา

- 2.7 นำสิ่งสกัดในแฟรกชันที่ RB_{B7-10} และ RB_{B8-11} มาแยกสกัดด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography *Waters 600 Controller* ซึ่งประกอบด้วย UV photodiode array detector (*Waters 996*) และ C₁₈ reversed phase column (*Prep Nova Pak, Waters*) เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้สารละลายผสมของ อะซิโตนไตรลและน้ำอัตราส่วนต่อปริมาตร 50:50 เป็นตัวพา
- 2.8 นำสารสกัดที่สารบริสุทธิ์จากข้อ 2.7 มาระเหยให้แห้งและตรวจสอบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังต่อไปนี้
- 2.8.1 วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากข้อ 2.7
- 2.8.1.1 วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันนัลด้วยเครื่องมือดังนี้
- Ultraviolet-Visible spectrophotometer
 - Infrared spectrophotometer
- 2.8.1.2 วิเคราะห์หาโครงสร้างโมเลกุลด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์จากข้อ 2.7 โดยใช้เครื่อง *Bruker DRX-400* or *Bruker AV-500* ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลดังนี้
- The ¹H- NMR spectral data
 - ¹³C- NMR spectral data
 - DEPT, ¹H, ¹H-COSY NMR spectral data
 - NOESY NMR spectral data
 - HMQC NMR spectral data
 - HMBC NMR spectral data
- 2.8.2 วิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์จากข้อ 2.7 ด้วยวิธี
- Electro spray-ionization time-of-flight mass spectrometry
(ESI-TOF-MS) โดยใช้เครื่อง *Micromass-LCT* mass spectrometer
- 2.9 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้จากข้อ 2.7 ในรายการดังนี้
- 2.9.1 Antimalarial activity
- Antimalarial activity ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการยับยั้งเชื้อปรสิต *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug-resistant strain) โดยใช้วิธีของ Trager และ Jensen [6] คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองตรวจสอบด้วยวิธี microculture radioisotope technique ซึ่งใช้เทคนิคพื้นฐานของ Desjardins และคณะ [7]

2.9.2 Antituberculous activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

เป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra โดยใช้ Croplate Alamar Blue Assay (MABA) [8] และเทคนิคแบบ Two-fold dilution โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 200 mg/L และบันทึกค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สารมาตรฐานไอโซเนียซิด (isoniazid) และคานาไมซินซัลเฟต (Kanamycin sulfate) เป็นสารอ้างอิง

2.9.3 Anti *Candida albicans* activity

ทดสอบโดยใช้เทคนิควิธีแบบ colorimetric method ซึ่งค้นพบโดย Hawser และคณะ [9] ในการทดลองนี้ใช้ Amphotericin B เป็นสารมาตรฐานที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.9.4 Cytotoxicity against KB and BC cell lines

ทดสอบโดยใช้สารอ้างอิงของ Ellipticine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในสัตว์ทดลอง KB และ BC cell lines ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.2-0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.9.5 Cytotoxicity against NCI-H187

ในการทดสอบนี้ใช้วิธีการแบบ colorimetric method ซึ่งค้นพบโดย Skehan และคณะ [10]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองดังกล่าวข้างต้นสามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด มีน้ำหนัก 110.78 และ 75.92 มิลลิกรัมคิดเป็นน้ำหนัก 0.43 และ 0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุลและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ มีรายละเอียดดังนี้

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุล

สิ่งสกัดจากเปลือกรากกันเกรา ถูกนำมาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ที่มีขนาด 60-120 mesh (Merck) และเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ โพนอร์ซินอล (สารบริสุทธิ์ที่ 1) [11] และนัวคลิดอล (สารบริสุทธิ์ที่ 2) [12] ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิด วิเคราะห์และเปรียบเทียบยืนยันสูตรโครงสร้างจากข้อมูลที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ที่แยกสกัดได้จากข้อ 2.7 ซึ่งได้ดำเนินการตามลำดับในข้อ 2.8 และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในข้อ 2.9 ปรากฏผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 1. ค่า ^1H - และ ^{13}C -NMRสเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 1 ที่ 500 และ 125 MHz ตามลำดับ ในสารละลาย CDCl_3 (ค่า δ มีหน่วยเป็น ppm, ค่า J มีหน่วยเป็น Hz)

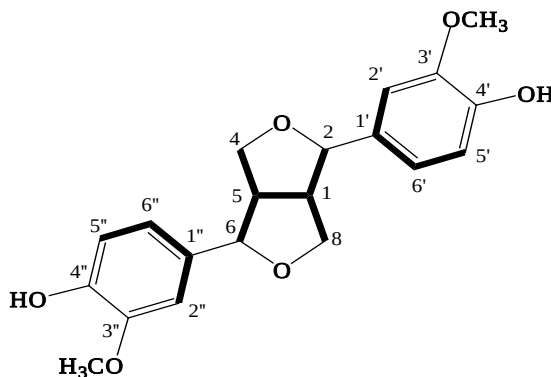
ตำแหน่ง	^1H	^{13}C
H-C-1	3.10 (<i>m</i>)	54.12
H-C-5	3.10 (<i>m</i>)	54.12
H-C-2	4.74 (<i>d</i> , $J = 4.20$)	85.91
H-C-6	4.74 (<i>d</i> , $J = 4.20$)	85.91
H-C-4ax	3.80 (<i>d</i> , $J = 7.00, 3.41$)	71.70
H-C-4eq	4.24 (<i>m</i>)	71.70
H-C-8ax	3.80 (<i>d</i> , $J = 7.00, 3.41$)	71.70
H-C-8eq	4.24 (<i>m</i>)	71.70
C-1'	-	132.83
C-1''	-	132.83
H-C-2'	6.95 (<i>s</i>)	107.74
H-C-2''	6.95 (<i>s</i>)	107.74
C-3'	3.91(<i>s</i>)	146.80
C-3''	3.91(<i>s</i>)	146.80
C-4'	-	145.23
C-4''	-	145.23

สารบริสุทธิ์ที่ 1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองใส มีสูตรทั่วไปที่ขึ้นช้้นจากข้อมูลของ ESI-TOF-MS คือ $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$ สำหรับข้อมูลจาก IR สเปกตรัม แสดงสัญญาณที่ความถี่ (ν_{max}) ต่างๆดังนี้ ความถี่ 3406 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของหมู่ O-H) ความถี่ $1604, 1517\text{ cm}^{-1}$ (การสั่นแบบยืดของพันธะ C=C ในโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติก) ความถี่ 1463 cm^{-1} (การสั่นนอกกรอบแบบเดิมของหมู่เมทิลีน $-\text{CH}_2-$) ความถี่ 1272 cm^{-1} (การสั่นแบบงอของหมู่ O-H) ความถี่ 1031 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของพันธะ C-O) ความถี่ 1022 cm^{-1} และ 776 cm^{-1} (การสั่นแบบนอกระนาบของพันธะ O-H) ส่วนข้อมูลของ UV-Visสเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 205, 230 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ

จากข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR สเปกตรัม สัญญาณของ ^{13}C -NMR มีจำนวนเพียง 10 สัญญาณ ในขณะที่ข้อมูลจากแมสสเปกตรัมบ่งชี้ว่าโครงสร้างโมเลกุลของสารนี้มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 20 อะตอม แสดงว่ามีสมมาตรโครงสร้างของอะตอมคาร์บอนในตำแหน่ง C-2 และทำให้ทราบว่าสารนี้มีโครงสร้างโมเลกุลแบบลิแกน (Lignan)

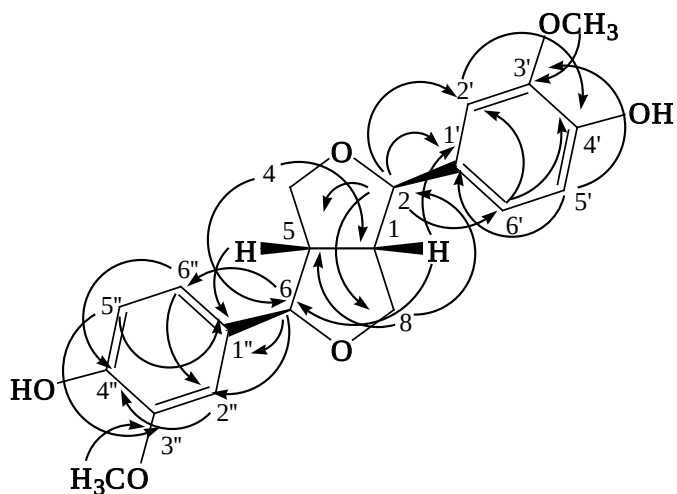
สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1 สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จาก ^1H -NMR สเปกตรัม (ในสารละลาย CDCl_3) ซึ่งแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้ สัญญาณ δ_{H} 3.10(*m*) เป็นของกลุ่มเมทิล (-CH) ในตำแหน่ง C-1 และ C-5 ส่วนสัญญาณที่ δ_{H} 4.74 (*d*, $J = 4.20$) เป็นกลุ่มเมทิล ของออกซิเจนในตำแหน่ง C-2 และ C-6 สัญญาณของกลุ่มเมทิลลินที่ไม่สมมาตรปรากฏที่ δ_{H} 3.80 (*d*, $J = 7.00, 3.41$) และ 4.24(*m*) ในตำแหน่ง C-4ax กับ C-4eq และ C-8ax กับ C-8eq สัญญาณของกลุ่มเมทิลอีเทอร์ (-OMe) ปรากฏที่ δ_{H} 3.91(*s*) ในตำแหน่ง C-3' และ C-3'' นอกจากนี้ปรากฏสัญญาณของอะโรมาติกเรโซแนนซ์ทั้ง 3 แห่งระหว่างค่า δ_{H} 6.82-6.85

ข้อมูลของ ^{13}C -NMR สเปกตรัมมีทั้งหมด 20 สัญญาณ ซึ่งยืนยันสอดคล้องกันกับข้อมูลจาก DEPT ว่าประกอบด้วยสัญญาณที่เป็นของอะตอมคาร์บอนของหมู่ เมทิล(-CH)10 สัญญาณ หมู่เมทิลิน (-CH₂) 2 สัญญาณ หมู่เมทิล (-CH₃) 2 สัญญาณ และควอเตอร์คาร์บอน 6 สัญญาณ



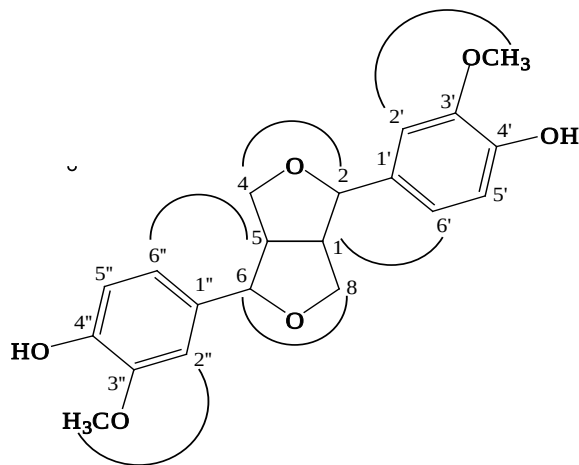
รูปที่ 1. ข้อมูลจาก ^1H , ^1H -COSY สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่ 1

ข้อมูลจาก ^1H , ^1H -COSY สเปกตรัม (รูปที่ 1) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนของอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลดังนี้ H-C-1 (หรือ H-C-5) และ H-C-2 (หรือ H-C-6); H-C-1 (หรือ H-C-5) และ H-C-8 (หรือ H-C-4); และระหว่างโปรตอนของวงแหวนอะโรมาติกดังนี้ H-C-2' (หรือ H-C-2'') และ H-C-6' (หรือ H-C-6''), และ H-C-5' (หรือ H-C-5'') และ H-C-6' (หรือ H-C-6'')



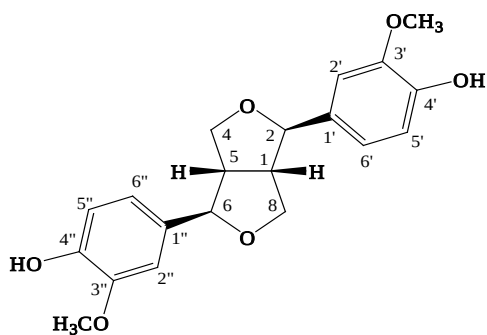
รูปที่ 2. ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระนาบไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ¹H-, ¹³C- long range correlationsของสารบริสุทธิ์ที่ 1

ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 1 (รูปที่ 2) ยืนยันสูตรโครงสร้างดังกล่าวโดยแสดง¹H-, ¹³C- long range correlations จาก H-C-1 (หรือ H-C-5) ไปยังตำแหน่งของ C-1' (หรือ C-1'') และตำแหน่ง C-6 (หรือ C-2); H-C-2 (หรือ H-C-6) ไปยังตำแหน่ง C-1' (หรือ C-1''), C-2' (หรือ C-2''), C-6' (หรือ C-6''), C-5 (หรือ C-1), และตำแหน่ง C-8 (หรือ C-4); จากตำแหน่ง H-C-4 (หรือ H-C-8) ไปยังตำแหน่ง C-1 (หรือ C-5), และจากตำแหน่ง C-6 (หรือ C-2); H-C-2' (หรือ H-C-2'') ไปยังตำแหน่ง C-4' (หรือ C-4''); จากตำแหน่ง H-C-5' (หรือ H-C-5'') ไปยังตำแหน่ง C-1' (หรือ C-1''), และตำแหน่ง C-3' (หรือ C-3''); จากตำแหน่ง H-C-6' (หรือ H-C-6'') ไปยังตำแหน่ง C-2' (หรือ C-2''), และ C-4' (หรือ C-4''); และ OMe-3' (หรือ OMe-3'') ไปยังตำแหน่ง C-3' (หรือ C-3'')



รูปที่ 3. ข้อมูลจาก NOESY สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนในตำแหน่งอะตอมคาร์บอนต่างๆในโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่ **1**

ข้อมูลจาก NOESY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ **1** (รูปที่ 3) ยืนยันสูตรโครงสร้างดังกล่าวโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่ง H-C-5 (หรือ H-C-1) และ H-C-6'' (หรือ H-C-6'); ตำแหน่ง H-C-2 (หรือ H-C-6) และ H-C-4 (หรือ H-C-8); ตำแหน่ง OMe-3' (หรือ OMe-3'') และ H-C-2' (หรือ H-C-2'') จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังกล่าวข้างต้นยืนยันให้ทราบว่าสารบริสุทธิ์ที่ **1** คือไพโนเรซินอล (Pinosresinol) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4. โครงสร้างโมเลกุลของไพโนเรซินอล

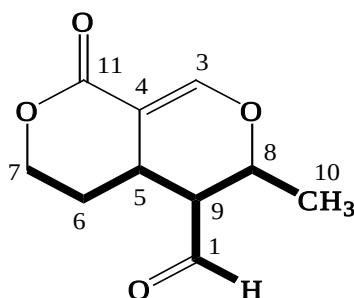
ตารางที่ 2. ค่า ^1H - และ ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 2 ที่ 500 และ 125 MHz ตามลำดับ ในสารละลาย CDCl_3 (ค่า δ มีหน่วยเป็น ppm, ค่า J มีหน่วยเป็น Hz)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C
H-C-1	9.98 (<i>d</i> , $J = 1.88$)	200.44
H-C-3	7.87 (<i>d</i> , $J = 2.02$)	155.80
C-4	-	103.33
H-C-5	2.95 (<i>tq</i> , $J = 12.41, 1.52$)	31.47
H-C-6a,b	1.61-2.14 (<i>m</i>)	27.33
H-C-7a,b	4.43-4.44 (<i>m</i>)	67.71
H-C-8	4.12 (<i>dq</i> , $J = 14.41, 4.42$)	73.22
H-C-9	2.38 (<i>td</i> , $J = 10.25, 2.91$)	55.60
H-C-10	1.50 (<i>d</i> , $J = 6.34$)	19.33
C-11	-	165.0

สารบริสุทธิ์ที่ 2 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลือง มีสูตรทั่วไปที่ยืนยันจากข้อมูลของ ESI-TOF-MS คือ $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ข้อมูลจาก IR สเปกตรัม แสดงสัญญาณที่ความถี่ (ν_{max}) ต่างๆดังนี้ ความถี่ 3019 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของพันธะ C-H) ความถี่ 1704 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของพันธะ C=O ในโครงสร้างเอสเทอร์ที่เป็นวงแหวน) ความถี่ 1475 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของหมู่เมทิลีน $-\text{CH}_2-$) ความถี่ 1216 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของพันธะ C-O-C) และที่ความถี่ 772 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของพันธะ C-O-C) ส่วนข้อมูลของ UV-Vis สเปกตรัม แสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 203 และ 247 นาโนเมตร ตามลำดับ

สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ 2 สอดคล้องกับข้อมูลจาก ^1H -NMR สเปกตรัม (ในสารละลาย CDCl_3) ซึ่งแสดงในตารางที่ 2 ดังนี้ สัญญาณ δ_{H} 4.43-4.44 (*m*) และ 1.61-2.14 (*m*) เป็นสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีน 2 หมู่ที่อยู่ติดกันคือ H-C-7 และ H-C-6 ตามลำดับ สัญญาณที่ δ_{H} 1.50 (*d*, $J = 6.34\text{ Hz}$) เป็นของโปรตอนหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง H-C-10 และสัญญาณที่ δ_{H} 2.38 (*td*, $J = 10.25, 2.91\text{ Hz}$) เป็นของโปรตอนในหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง H-C-9, H-C-8 ส่วนสัญญาณที่ δ_{H} 4.12 (*dq*, $J = 14.41, 4.42\text{ Hz}$) เป็นของตำแหน่ง H-C-8, สัญญาณที่ δ_{H} 2.95 (*tq*, $J = 12.41, 1.52\text{ Hz}$) เป็นของตำแหน่ง H-C-5 และสัญญาณที่ δ_{H} 7.87 (*d*, $J = 2.02\text{ Hz}$) เป็นของโปรตอนในตำแหน่ง H-C-3 และมีสัญญาณของแอลดีไฮด์โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 9.98 (*d*, $J = 1.88\text{ Hz}$) ในตำแหน่ง H-C-1

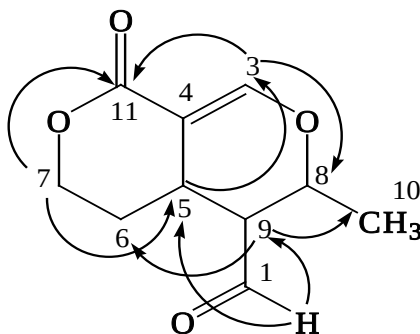
จากการวิเคราะห์ข้อมูล ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 2 ปรากฏสัญญาณจำนวน 10 สัญญาณ เมื่อนำข้อมูลจากสเปกตรัมของ DEPT และ HMQC มาวิเคราะห์ร่วมด้วยทำให้ทราบว่าประกอบด้วย หมู่เมทิล 5 กลุ่ม หมู่เมทิลีน 2 กลุ่ม หมู่เมทิล 1 กลุ่ม และควอเตอร์นารีคาร์บอน 2 อะตอมและปรากฏสัญญาณที่ δ_c 200.44 ของตำแหน่ง C-1 ซึ่งเป็นแอลดีไฮด์คาร์บอนที่ยืนยันด้วยข้อมูลจากสเปกตรัมของ HMQC สัญญาณที่ δ_c 165.00 เป็นของอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งที่ C-11 ยืนยันด้วยพีคของ IR สเปกตรัมที่ 1704 cm^{-1} แสดงให้ทราบว่าป็นหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์สัญญาณของหมู่เมทิลีนที่ δ_c 67.71 ในตำแหน่งของ C-7 เป็นของอะตอมคาร์บอนที่เกาะอยู่กับออกซิเจนและเชื่อมต่อกับหมู่เมทิลีนในตำแหน่ง C-6 (δ_c 27.33)



The bold lines show connectivities from ^1H , ^1H -COSY

รูปที่ 5. ข้อมูลจาก ^1H , ^1H -COSY สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนของอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่ 2

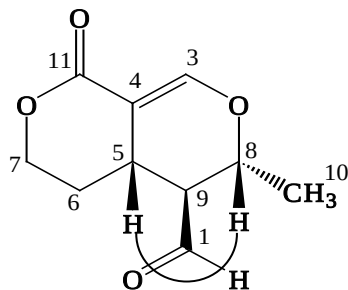
ในทำนองเดียวกันข้อมูลจากสเปกตรัมของ ^1H , ^1H -COSY (รูปที่ 5) แสดงการเชื่อมต่อกันของอะตอมคาร์บอนจากตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้ H-C-1/ H-C-9/ ไปยังตำแหน่งของ H-C-8/ H-C-10 และเชื่อมผ่านไปยังตำแหน่งของ H-C-5/ H-C-6/ H-C-7



The curved arrows show HMBC correlations of compound X

รูปที่ 6. ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระยะไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ ^1H -, ^{13}C - long range correlations ของสารบริสุทธิ์ที่ 2

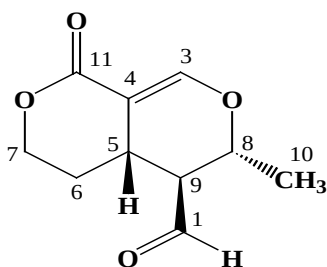
ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัม (รูปที่ 6) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งต่างๆดังนี้ จากตำแหน่ง H-C-1 ไปยังตำแหน่ง C-5 และ C-9; จากตำแหน่ง H-C-3 ไปยังตำแหน่ง C-8 และ C-11; จากตำแหน่ง H-C-5 ไปยังตำแหน่ง C-3; จากตำแหน่ง H-C-7 ไปยังตำแหน่ง C-5 และ C-11; และจากตำแหน่ง H-C-9 ไปยังตำแหน่ง C-6 และ C-10 ตามลำดับ



NOESY correlations of compound X

รูปที่ 7. ข้อมูลจาก NOESY สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนในตำแหน่งอะตอมคาร์บอนต่าง ๆ ในโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่ 2

ข้อมูลจาก NOESY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 2 (รูปที่ 7) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนในตำแหน่งอะตอมคาร์บอนต่าง ๆ ในโครงสร้างโมเลกุลดังนี้ระหว่าง H-C-5 และ H-C-8 ซึ่งเป็นการยืนยันสเตอริโอเคมีของสารประกอบ 2 ได้อย่างชัดเจนสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่ 2 แสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8. โครงสร้างโมเลกุลของน้ำคอลลอยด์

3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารบริสุทธิ์ที่ 1 คือไพโนเรซินอลมีฤทธิ์ยับยั้งมาลาเรียด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ด้วยค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไล่น้ะเร็งชนิด KB และ BC ในปริมาณที่มากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albican* ที่ปริมาณมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารบริสุทธิ์ที่ 2 คือน้ำคลิดอลสามารถยับยั้ง NCI-H187 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 18.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแต่จะต้องใช้ในปริมาณมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการออกฤทธิ์ต่อ KB and BC cell lines และพบว่า มีฤทธิ์อย่างอ่อนต่อ anti-TB activity ด้วยค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนอกจากนี้ยังไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง K1 malarial parasite strain ด้วยค่า IC_{50} ที่สูงมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเปลือกรากต้นกันเกราพบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดได้แก่ สารบริสุทธิ์ที่ 1 คือ ไพโนเรซินอล (Pinoresinol) มีข้อมูลสำคัญดังนี้

ลักษณะ ของแข็งสีเหลือง

UV(MeOH): 205(1.89), 230(0.65), and 280(0.25) nm.

IR (nujol): 3404, 1603, 1517, 1463, 1273, 1034, 1022, 776

¹H- and ¹³C-NMR: ดูตารางที่ 1

ESI-TOF-MS: 381.1312 ([M+Na]⁺, [C₂₀H₂₂O₆] + [Na]⁺; calc 381.1316).

ไพโนเรซินอลยังถูกสกัดได้จากพืชขึ้นต้นหลายชนิดที่ได้มีการรายงานไว้ได้แก่ *Magnolia fargesii* [11] *Fagraearacemosa* [13] และ *Forsythia intermedia* [14]

สารบริสุทธิ์ที่ 2 คือน้ำคลิดอล (Naucledal) มีข้อมูลสำคัญดังนี้

ลักษณะ ของแข็งสีขาวฐานสีเหลือง

UV(MeOH): 203(0.52) and 247(0.97)

IR (nujol): 3020, 1707, 1477, 1217, 772

¹H- and ¹³C-NMR: see Table2. ESI-TOF-MS: 219.0625 ([M+Na]⁺, [C₁₀H₁₂O₄] + [Na]⁺ calc 219.0635)

สำหรับน้ำคลิดอล มีข้อมูลทาง ¹H- และ ¹³C-NMR สเปกโตรสโคปีรายงานในปี พ.ศ. 2520 โดย Purdy และคณะ[12]

นอกจากนี้สารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดที่สกัดได้จากเปลือกรากต้นกันเกราคือ ไพนอเรซินอลและน้ำมันคลิโดลมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะไพนอเรซินอลมีฤทธิ์ยับยั้งมาลาเรียด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้แสดงไว้ในสรุปผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล นักวิจัยอาวุโสแห่งสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (สวทช.) และ ดร. ประสาท กิตติคุปต์ แห่งสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่สนับสนุนเงินทุนในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Smitinand, T. and Lasen, K., 1984. Flora of Thailand. *The TISTR Press*, 4 (1), 20-21.
- [2] Wongsatit, C., 1996. Medicinal Plants in SiriRuckhachati Garden. 2nded. Amarin printing. Bangkok. p.96.
- [3] Natarajan, P. N., Wan, Alfred S. C., and Zaman, V. 1974. Antimalarial, antiamoebic and toxicity tests on gentianine. *Planta Medica*. 25, 258-260.
- [4] Kun-anake, A. and Ragvatin, C., 1976. Bitter glucoside from leaves of Kan-grau. *Department of Medical Sciences Bulletin*, 18 (1), 1-11.
- [5] Wan, A. S. C., Macko, E. and Douglas, B., 1972. Pharmacological investigations of gentianine from *Fagraea fragrans* Roxb. *Asian Journal of Medicine*, 8, 334-335.
- [6] Trager, W. and Jensen, J.B., 1976. Human malarial parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673.
- [7] Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16, 710
- [8] Collins, L. and Franzblau, S. G., 1997. Microplate alamar blue assay vs. BACTEC 460 for screening natural products against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1004

- [9] Hawser, S.P., Norris, H., Jessup, C. J. and Ghannoum, M. A., 1998. Comparison of a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenylamino)Carbonyl]-2*H*-Tetrazolium Hydroxide (XTT) Colorimetric Method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of Testing Clinical Yeast Isolates for Susceptibility to Antifungal Agents *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1450
- [10] Skehan, P., Storeng, R. Scudiero, D. Monks, A., Macmahon, J., Visitica, D., Warren, T. J., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of Natural Product*, 82,1107
- [11] Miyazawa, M.,Kasahara, H. and Kameoka, H., 1992. Phenolic lignans from flower buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry*, 31 (10), 3666-3668.
- [12] Purdy, J. and Mclean, S., 1977. Constituents of *Naucleadiderrichii*. part IX. conversion of sweroside tonaucledal and 3-epinaucledal. *Canadian Journal of Chemistry* 55, 4233-4237.
- [13] Okuyama, E., Suzumura, K. and Yamazaki, M., 1995. Pharmacologically active components of TodoponPuok (*Fagraearacemosa*), A medicinal plant from Borneo. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43 (2), 2200-2204.
- [14] Rahman, M. M. A., Dewick, P. M., Jackson, D. E. and Lucas, J. A., 1990. Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 29 (6), 1971-1980.