



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การพัฒนาสาร Neuroprotective ชนิดใหม่
กลุ่ม coumarins จากเปลือกกรากต้นส่องฟ้า

โดย : นางสาวเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ : 29 มกราคม 2554

สัญญาเลขที่ MRG518017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การพัฒนาสาร Neuroprotective ชนิดใหม่ กลุ่ม
coumarins จากเปลือกกรากต้นส่องฟ้า
(Development of a New Neuroprotective Agent of
Coumarins from the Root Bark of *Clausena*
harmandiana (Pierre) ex.)

นางสาวเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้เกิดขึ้นและสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ด้วยทุนวิจัยอาจารย์รุ่นใหม่ประจำปี 2551 ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย อีกทั้งการสนับสนุนเงินทุนวิจัยบางส่วนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้อำนวยความสะดวกและสถานที่ในการทำงานวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช ที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ อ.ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์ ที่ให้คำแนะนำและสารเคมีบางส่วน รศ.ดร. จวี เย็นใจ และ รศ.ดร. จินดา หวังบุญสกุล ที่ให้คำแนะนำและแนวทางในการทำวิจัยชิ้นนี้ และขอขอบพระคุณ Prof. Naoki Saito ที่ให้การสนับสนุนสารเคมีและคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และคุณยายที่ให้กำลังใจและสอนเรื่องภูมิปัญญาในการช่วยหาแหล่งเก็บตัวอย่างต้นสองฟ้าให้แก่ข้าพเจ้า

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG518017
ชื่อโครงการ : การพัฒนาสาร Neuroprotective ชนิดใหม่กลุ่ม coumarins
จากเปลือกกรากต้นส่องฟ้า
ชื่อนักวิจัย : อ.ดร. เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
E-mail Address : pploenthip@kku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี เริ่มตั้งแต่ 15 พฤษภาคม 2551 -14 พฤษภาคม 2553

Clausena harmandiana หรือที่เรียกอีกชื่อว่า ส่องฟ้า หรือส่องฟ้าแดง อยู่ในวงศ์ Rutaceae พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย อดีตมีการนำรากมาใช้เป็นยารักษาอาการปวดท้อง แก้ไข้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ neuroprotective จากสารกลุ่มคูมารินที่แยกได้จากเปลือกกรากต้นส่องฟ้า จากการทดลองโดยอาศัยการแยกสารตามฤทธิ์พบว่าสามารถแยกได้สารกลุ่มคาร์ลาโซลที่เคยมีรายงานมาแล้วจำนวน 4 ตัวและสารกลุ่มคูมาริน 3 ตัว ได้แก่ heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxycarbazole, mukonal, xanthoxyletin, dentatin และ nordentatin ตามลำดับ จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ TBAR พบ สาร heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline และ nordentatin มีฤทธิ์ดีที่สุดในกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงได้นำสาร nordentatin มาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีโดยเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของเอสเทอร์ ซึ่งสามารถเตรียมได้ทั้งสิ้น 16 อนุพันธ์ และสามารถเตรียมได้ในปริมาณสูง (90-100 % yield) เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการต้านฤทธิ์ไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน พบว่าสารต้นแบบคือ nordentatin มีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาคือ อนุพันธ์ ที่ 1, 4, 11, 12, 14 และ 16 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า nordentatin และอนุพันธ์ มีศักยภาพสูงที่จะนำมาทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงพัฒนาต่อไป

คำหลัก : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คูมาริน นอร์เดนทาทีน สารนิวโรโพรเทคทีฟ

Abstract

Project Code : MRG518017
Project Title : Development of a New Neuroprotective Agent of Coumarins from the Root Bark of *Clausena harmandiana* (Pierre) ex.
Investigator : Dr. Ploenthip Puthongking, Faculty of Pharmaceutical sciences, Khon Kaen University
E-mail Address : pploenthip@kku.ac.th
Project Period : 2 years, 15 May 2008 -14 May 2010

Clausena harmandiana (Rutaceae) is distributed mainly in the northeast of Thailand, whose roots and root bark are reputedly used in folk medicine for stomach ache, and fever, revealed the presence of coumarins and carbazole alkaloids. Therefore, this present investigation aimed to develop a new class of neuroprotective agents from the coumarins isolated from the root bark of *Clausena harmandiana*. Bioassay-guided investigation of the root bark of *Clausena harmandiana* has led to the isolation of 4 known carbazole alkaloids and 3 coumarins as heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxy-carbazole, mukonal, xanthoxyletin, dentatin and nordentatin, respectively. The known compounds were identified structure by comparison of their spectroscopic and physical data with those reported in the literature. Recently, we found that the neuroprotective components were heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline and nordentatin which displayed potent in the primary screening with DPPH and TBAR assays, and in addition, nordentatin was the most potent antilipid peroxidation in both assays. The most interesting result attempts our group decided to synthesize additional analogues of the isolated nordentatin to determine structure-activity relationship (SAR) and possibly develop more potent neuroprotective agents. Therefore, the starting nordentatin was prepared to 16 ester-analogues under the condition of acid chlorides in pyridine to give the yield of products in the rang of 90-100 %. All preparation compounds were evaluated activity in TBAR assay and the data revealed that nordentatin shown the highest activity. And the ester derivatives as cpds. 1, 4, 11, 12, 14 and 16 also shown promising activity similar to nordentatin. Therefore, nordentatin and its ester derivatives are consequently might be useful for the next develops to the new candidate neuroprotective agents.

Keywords : Antioxidant activity, coumarin, nordentatin and neuroprotective agent

สารบัญ

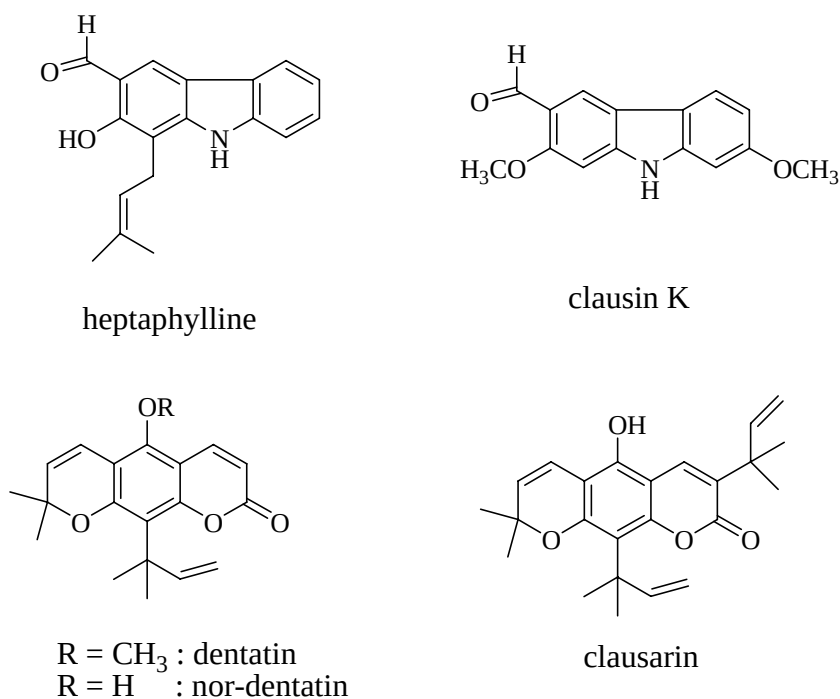
	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	4
การทดสอบฤทธิ์ต้านไลโปดด้วยวิธี TBAR	4
บทที่ 3 วิธีการ และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	6
การเก็บตัวอย่างต้นสอ่งฟ้าแดง	6
การแยกสกัดสาร coumarin จากต้นสอ่งฟ้าแดง	6
การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้าง	6
การเตรียมสารอนุพันธ์ nordentatin	6
การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	7
การทดสอบฤทธิ์ต้านไลโปดด้วยวิธี TBAR	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	10
บทที่ 5 บทสรุป	15
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก 1	
สรุปการเงิน	19
ภาคผนวก 2	
แสดงกราฟการหาค่า IC_{50} ด้วยวิธี TBAR	21
ภาคผนวก 3	
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	26

บทที่ 1 บทนำ

ปัจจุบัน เมืองไทยมีการตื่นตัวในการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาพัฒนาต่อเป็นยาหรือเภสัชภัณฑ์มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ในเรื่องของทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพร ซึ่งมีการนำใช้เป็นยารักษาโรคมาตั้งแต่สมัยอดีต ปัจจุบันมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์แสดงว่าสมุนไพรในประเทศไทยมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอีกหนึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นอีกหนึ่งเป้าหมายที่นักวิจัยพยายามศึกษาค้นคว้า ทั้งนี้เพราะสารอนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในหลายระบบของร่างกาย และสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อไปเป็นยารักษาโรคต่างๆได้ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและการส่งสัญญาณสื่อ โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด และโรคมะเร็ง¹ เป็นต้น จากภูมิปัญญาไทยได้มีการนำต้นสองฟ้าที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clausena harmandiana* (Pierre) มาต้มน้ำดื่มแก้อาการท้องอืด และลดไข้² ประกอบกับรายงานการวิจัยพบสารสำคัญในเปลือกกรากเป็นสารกลุ่ม alkaloids และ coumarins³ ดังแสดงในรูปที่ 1 สารเหล่านี้เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นพบว่ามีฤทธิ์ cytotoxicity^{4,5}, antimalaria^{6,7}, antimicrobial และ antifungal⁸ เป็นต้น นอกจากนี้ คณะของ รศ. ดร. จินดา หวังบุญสกุล คณะเภสัชศาสตร์ และ รศ. ดร. จวี เย็นใจ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกกรากต้นสองฟ้า ประกอบด้วยสาร dentatin, nordentatin, heptaphylline, osthol และ xanthoxyletin มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง lipid-peroxidation พบสาร heptaphylline และ nordentatin สามารถยับยั้ง lipid-peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญด้วยค่า IC_{50} (μM) ตามลำดับดังนี้คือ 14.1 และ 2.9 เมื่อเทียบกับ วิตามิน อี ($IC_{50} = 59.3 \mu M$) ส่วนสาร dentatin ซึ่งเป็น methoxy-derivative ของ nordentatin สามารถยับยั้ง lipid-peroxidation ด้วยค่า $IC_{50} = 78.4 \mu M$ ผลการทดลองดังกล่าวสนับสนุนคุณสมบัติทางโครงสร้างที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่จะต้องเป็นสารประกอบฟีนอลิก ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่ ความสัมพันธ์ทางโครงสร้างเคมีดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์จากเปลือกกรากต้นสองฟ้าโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร nordentatin เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพสูงที่จะสามารถพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ รวมถึงการพัฒนาต่อไปเป็นยารักษาโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น

เนื่องจากมีรายงานการสกัดแยกสารจากเปลือกกรากต้นสองฟ้าพบว่าสามารถแยกสาร dentatin และ nordentatin จากสารสกัดชั้น hexane ได้ในปริมาณสูงคือ 0.24 % และ 0.023 % ของน้ำหนักแห้ง² ตามลำดับ และจนถึงปัจจุบันมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารบริสุทธิ์จากเปลือกกรากต้นสองฟ้าน้อยมาก ทั้งยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญจากเปลือกกรากต้นสองฟ้าจากวารสารต่างๆ รวมถึงการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ๆ ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้จากเปลือกกรากต้นสองฟ้า รวมถึงการเตรียมอนุพันธ์ใหม่ๆ ที่อาศัยวิทยาการทางเคมีเข้ามาช่วย ในการทำวิจัย

ครั้งนี้จะนำสาร dentatin ที่สามารถสกัดแยกได้จากเปลือกรากต้นสอ่งฟ้า เป็นสารตั้งต้น (lead compound) ในการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีบางส่วน เพื่อให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ดีขึ้น ในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จะนำสารสำคัญที่สกัดแยกได้รวมถึงสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในหลอดทดลอง ด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) โดยจะประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] (สีม่วง) ให้เปลี่ยนเป็น DPPH (สีเหลือง) ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ โดยวัดการลดลงของสีที่ความยาวคลื่น 517 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเมื่อนำค่าดังกล่าวมาเทียบกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองจะสามารถหาค่า IC₅₀ ของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยข้อมูลในการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีบางส่วนของสาร nordentatin เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า IC₅₀ แล้วจะสามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารกลุ่ม coumarins กับความสามารถในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างสารสำคัญที่เคยมีรายงานพบในเปลือกรากต้นสอ่งฟ้า

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีขนาดโมเลกุลเล็ก โดยใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ และสมุนไพรมาดัดแปลงโครงสร้างให้มีคุณสมบัติทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดีขึ้นกว่าสารตั้งต้นที่พบตามธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำหน้าที่ชะลอ หรือป้องกันการเกิดขบวนการ oxidation ได้ ในวงการแพทย์ยอมรับว่าพยาธิสภาพของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคมะเร็ง มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว จะช่วยในการป้องกัน หรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมากยืนยันถึงการชะลออัตราการเสี่ยง และเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคของระบบประสาทและการส่งสัญญาณสื่อ โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ² ซึ่งผลดังข้างต้นพบว่าเป็นมาจากการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบประเภท vitamines C, vitamines E, beta-carotene, flavonoids และสารกลุ่ม phenolics อื่นๆ เช่น phenolic acid, alkaloid, iridoids, terpenoids และ coumarins⁹⁻¹⁴ เป็นต้น

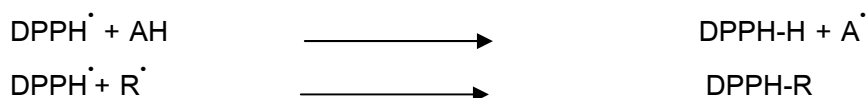
coumarins เป็นสารที่พบในพืชจำนวนมาก ทั้งพืชที่พบในประเทศไทยและต่างประเทศ มีรายงานว่าสารกลุ่ม coumarins เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นพบว่ามีฤทธิ์เป็น สารต้านมะเร็ง^{4-5,18} antimalaria^{6,7}, antimicrobial⁶⁻⁷, antifungal⁸ และ anti-inflammatory¹⁹⁻²⁰ จากรายงานดังกล่าว ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของสาร coumarins ต่อการแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าว รวมถึงการพัฒนาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีบางส่วนของสารกลุ่ม coumarin เพื่อหวังผลให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดีขึ้นกว่าสารต้นแบบ ดังเช่น การศึกษาดัดแปลงโครงสร้างสาร xanthyletin ซึ่งมีโครงสร้างหลักเรียกว่า coumarin พบว่าสาร xanthyletin เมื่อนำมาทดสอบทดสอบกับเซลล์มะเร็ง L-1210 พบว่าเมื่อเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ให้เป็น หมู่ acetate ซึ่งยังคงสามารถแสดงฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งได้ดีด้วยค่า IC₅₀ 6.5 และ 5.0 μ M ตามลำดับ⁵ และยังได้สังเคราะห์อนุพันธ์ ester ต่างๆ ด้วย¹⁵⁻¹⁷ นอกจากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของหมู่ hydroxyl บนโครงสร้างหลักของสาร coumarins แล้วยังได้ศึกษาหมู่อื่นๆที่แทนที่บนโครงสร้างของสาร coumarins ด้วยเช่นการศึกษาหมู่ dimethylpropyl บนโครงสร้างของสาร pyranocoumarins ต่อการออกฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง พบว่าสาร กลุ่ม pyranocoumarins และอนุพันธ์ที่มีการดัดแปลงตรงสาย dimethylpropyl ได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A459, MCF7, KB c และ KB-VIN รวมทั้งสามารถต้านเชื้อไวรัส HBV ได้ด้วย¹⁸

ในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบสาร dentatin และ nordentatin ใน ต้นสนโตก (*Clausena excavate*, Rutaceae) พบสารกลุ่ม แสดงฤทธิ์ antimicrobial และ antifungal⁸ และจากต้นสอฟ้า (*Clausena harmandiana*, Rutaceae) เนื่องจากการแยกสกัดสาร dentatin จากต้นสอฟ้าสามารถทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากรวมถึงสามารถแยกสารได้ในปริมาณสูง ทำให้มีสารตั้งต้นจากธรรมชาติปริมาณเพียงพอที่จะสามารถนำมาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นอื่นๆ รวมถึงฤทธิ์ใน

การต้านอนุมูลอิสระ และทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี โดยสารที่แยกได้จากธรรมชาติ และที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ในครั้งนี้จะได้นำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยวิธี DPPH assay และ TBAR assay ดังนี้

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 550 nm โดย DPPH[•] จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R[•]) ได้สมการคือ



ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC50) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] เหลืออยู่ 50% (10)การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า EC50 ทำโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน / ตัวอย่าง เพื่อหาค่า EC50 โดยคำนวณ %Remaining DPPH[•] และนอกจากนี้แล้วยังมีการรายงานในรูปของค่า IC50 ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC50 โดย คำนวณ % Inhibition DPPH[•] ดังสมการ :

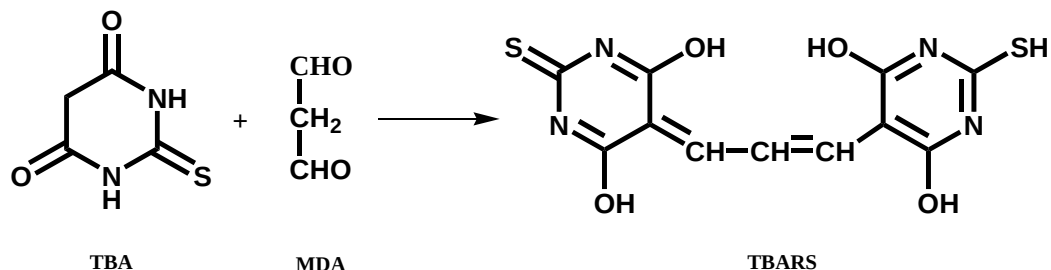
$$\% \text{ Inhibition DPPH} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{control}}}{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}} \right] \times 100$$

DPPH assay เป็นวิธีที่มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ antioxidant activity ของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี lipid peroxidation (TBAR assay)

Lipid peroxidation เป็นขบวนการทำลาย polyunsaturated fatty acids (PUFA) โดยปฏิกิริยา oxidation อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการผลิสารประกอบต่างๆ ตามลำดับคือ lipid hydroperoxide, cyclic peroxides, cyclic endoperoxides และผลิตภัณฑ์คือ สารประกอบ ketones และ aldehydes รวมถึง malondialdehyde (MDA) ผลิตผลจากกระบวนการ lipid peroxidation เหล่านี้ (รวมทั้ง MDA) สามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ในรูปของ

การรวมตัวเป็น adduct จึงนิยมเรียกการตรวจวัดภาวะ lipid peroxidation โดยวิธีนี้ว่า TBA test และเรียกกลุ่มของสารประกอบที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยานี้รวมกันว่า TBA reactive substance (TBARS) โดยหากตรวจพบ TBARS มากก็เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีกระบวนการ lipid peroxidation เกิดขึ้นมากได้



สำหรับการประเมินภาวะ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างชีววัตถุ โดยนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับ TBA ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดแก่ (pH3) ที่อุณหภูมิสูง โดยสาร MDA 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับ TBA ได้จำนวน 2 โมเลกุลได้สารประกอบเชิงซ้อนเป็น TBARS (TBA reactive substance) ที่มีสีชมพูและดูดกลืนแสงได้สูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 528-551 nm สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากต้นสอ่งฟ้า ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ประกอบกับข้อมูลในการดัดแปลงโครงสร้างสาร coumarins ต่อฤทธิ์อื่นๆ ทำให้คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะดัดแปลงโครงสร้างของสาร nordentatin ที่แยกได้จากสมุนไพรไทย ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ที่เป็นสารอนุพันธ์ของสาร nordentatin เพื่อพัฒนาต่อเป็น neuroprotective agents ที่จะสามารถพัฒนาต่อเป็นยารักษาโรคทางระบบประสาท เช่น โรค Alzheimer และโรค Parkinson เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ประเทศไทยสามารถผลิตยาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศเองได้ จึงเป็นการลดต้นทุนในการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทย รวมถึงการส่งเสริมให้สมุนไพรไทยเป็นที่รู้จักและยอมรับในระดับสากลอีกด้วย

3 วิธีการ และ เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้

- Acetic anhydride
- Benzoyl chloride
- 4-bromo benzoyl chloride
- 4-methoxy benzoyl chloride
- 4-nitro benzoyl chloride
- DMAP (Dimethylaminopyridine)
- Pyridine
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
- Perchloric acid
- Glacial acetic acid
- Thiobarbutiric acid
- Dichloromethane
- Hexane
- Ethyl acetate
- Ethanol

2. เครื่องมือ

- Rotary evaporator
- Magnetic stirrer
- Spectrophotometer
- Centrifuge
- Water-bath
- UV-spectrophotometer
- Micro plate reader

การทดลอง

1 เก็บตัวอย่างต้นสองฟ้าแดง

ทำการเก็บตัวอย่างต้นสองฟ้าแดง (*Clausena harmandiana*) จากจังหวัดกาฬสินธุ์ เมื่อ ปี พ.ศ. 2551 โดยจะทำการแยกเอาเฉพาะส่วนของเปลือกกราก มาล้าง และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดย่อยให้มีขนาดเล็ก เพื่อรอการสกัดแยกต่อไป

2 การสกัดแยกสาร coumarins จากต้นสอ่งฟ้า

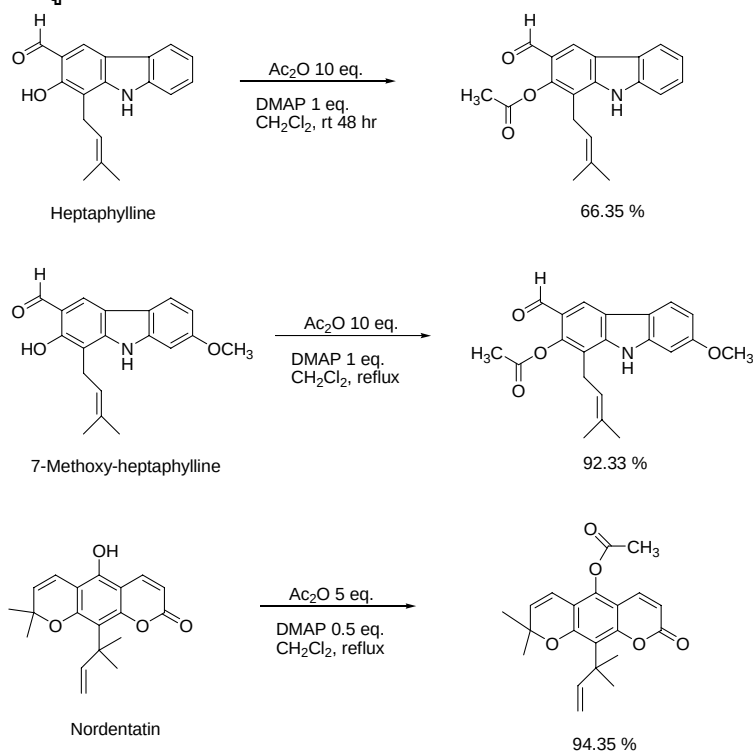
นำเปลือกกรากที่บดละเอียดแล้วมาหมักด้วย methanol จำนวน 3-4 ครั้ง จากนั้นนำส่วน methanol ที่กรองได้จากการหมัก ไประเหยแห้ง ด้วยเครื่อง rotary evaporator ส่วนกากที่เหลือ นำไปแช่สกัดด้วย methanol อีกครั้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง จากนั้นรวบรวมสารสกัดชั้น methanol-น้ำ ที่ทำให้เข้มข้นมาทำการ partition ต่อด้วย hexane และ dichloromethane ตามลำดับ นำส่วน hexane และ dichloromethane ที่ระเหยแห้งแล้วไปทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีทาง chromatography โดยใช้สารผสมของ chloroform, dichloromethane, ethyl-acetate, hexane และ methanol เป็นตัวชะ ดังแสดงตามแผนภาพที่ 1

3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin

สารที่สกัดแยกได้จากต้นสอ่งฟ้าทุกตัว รวมทั้งสารที่ได้จากการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีจะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเครื่อง IR spectroscopy, mass spectrometry และ NMR spectroscopy โดยทำการเปรียบเทียบกับสารเดิมที่มีอยู่ก่อนหน้าแล้ว

4 การเตรียมอนุพันธ์สาร nordentatin

ในขั้นตอนแรกจะเป็นการหาวิธีทางเคมีเพื่อเปลี่ยนสาร dentatin ให้เป็นสาร nor-dentatin จากนั้นจึงทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีบางส่วนที่หมู่ฟังก์ชันของสาร nordentatin และสาร dentatin เพื่อให้ได้อนุพันธ์ต่างๆ โดยในเบื้องต้นนำสาร heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline และ nordentatin มาทำอนุพันธ์ต่างๆ ดังแสดง จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งสารกลุ่ม carbazoles และ coumarins ดังรูปที่ 1 ได้มีการปรับเปลี่ยนจนได้สภาวะในการสังเคราะห์แบบเดียวกันหมด ดังนี้



รูปที่ 1 ภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์

สภาวะที่ใช้เตรียมสารอนุพันธ์ : นำสาร nordentatin (0.1 mmol) มาละลายในตัวทำละลาย pyridine ปริมาณ 1 มิลลิลิตรภายใต้ก๊าซไนโตรเจน หมุนจนสาร nordentatin ละลายหมด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปแช่ในน้ำแข็ง และหมุนประมาณ 5 นาที จากนั้นค่อยๆเติมสาร acid chloride หรือ anhydride ชนิดต่างๆ ปริมาณ 2.0 เท่า ของสารตั้งต้น ลงไปช้าๆ ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที หมุนสารละลายผสมทั้งหมดในน้ำแข็งต่อ อีก 5 นาที จึงยกออกมาหมุนต่ออุณหภูมิห้อง จนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ จึงนำสารละลายดังกล่าวมาสกัดด้วยน้ำและเอทิลอะซิเตท นำชั้นเอทิลอะซิเตทมาล้างด้วย 1 N HCl 3 ครั้ง ล้างต่อด้วย 5 % NaHCO₃ 3 ครั้ง และสุดท้ายให้ล้างด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว นำชั้นเอทิลอะซิเตทที่ได้มาดูดน้ำด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรองและล้างกระดาษกรองด้วยเอทิลอะซิเตท นำไประเหยแห้ง จากนั้นนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ต่อยด้วย column chromatography สุดท้ายได้สารอนุพันธ์ที่ต้องการในปริมาณตั้งแต่ 90-100 %

5. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จะทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกกรากต้นสอ่งฟ้า และทุกอนุพันธ์ที่สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธี DPPH โดยดูถึงความสามารถในการจับกับ DPPH radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร โดยสารดังกล่าวมีสีม่วง ในการทดลองหากสารสังเคราะห์สามารถจับกับ DPPH radical ได้สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองของ DPPH ซึ่งจะสามารถวัดค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ การแปลผลข้อมูลจะรายงานในรูปของค่า IC₅₀ โดยจะทำการเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารที่สังเคราะห์ได้และสารที่แยกได้จากธรรมชาติ

ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

1. เตรียม stock สาร DPPH radical ความเข้มข้น 10 mM โดยชั่งสาร 3.94 mg ละลายด้วย methanol 1mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 200 μ M โดยปิเปตสารจาก stock 10 mM 100 μ L ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 5 mL
2. เตรียมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. ปิเปตสารแต่ละความเข้มข้น 100 μ L ลงใน 96 wells-plate โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ 5 ซ้ำ, Control ใช้ ethanol 100 μ L, Blank ใช้ ethanol 200 μ L
4. ปิเปต 200 μ M DPPH ปริมาตร 100 μ L ลงในแต่ละ wells-plate ยกเว้น blank
5. เก็บให้พ่นแสง 30 นาที
6. นำไปวัด UV-spectrometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm

6. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไลโปด

ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี TBAR assay

การเตรียมสาร

- Phosphate buffer 4 mM pH 7.4 เตรียมโดย ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate 0.54 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 mL ปรับ pH ด้วย NaCl จนได้ pH = 7.4
- Potassium chloride 467 mM เตรียมโดย ชั่ง Potassium chloride 3.48 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL
- 1% TBA เตรียมโดยละลาย TBA ใน 50% Glacial acetic acid
- สมองหมู บดใน Phosphate buffer pH 7.4 ด้วยอัตราส่วน 2g : 19 mL

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม tube สำหรับความเข้มข้นของยาต่างๆ โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ N=4, Negative, Basal
2. Pipette phosphate buffer 1.15 mL + Potassium chloride 0.6 mL ลงในแต่ละ tube
3. เติมสารที่ต้องการทดสอบ 0.05 mL ลงใน tube (*Negative และ basal ใช้ ethanol)
4. เติมสมองหมู 0.2 mL ลงในแต่ละ tube (เขย่าก่อนดูดทุกครั้ง)
5. นำไป shake ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศา นาน 30 นาที (เกิดปฏิกิริยาได้ MDA) ยกเว้น basal แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
6. เติม 35% HClO₄ 0.4 mL ใส่ทุก tube (เพื่อหยุดปฏิกิริยาตกตะกอนโปรตีนและไขมัน) เขย่าให้เข้ากัน
7. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3000 rpm ที่ 4 องศา นาน 5 นาที
8. ดูด supernatant 1.5 mL ใส่ glass tube
9. เติม 1%TBA 0.5 mL
10. นำไป shake ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศา นาน 15 นาที (เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ MDA)
11. วัด Intensity TBARS โดยเครื่อง Spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น 528/551 nm

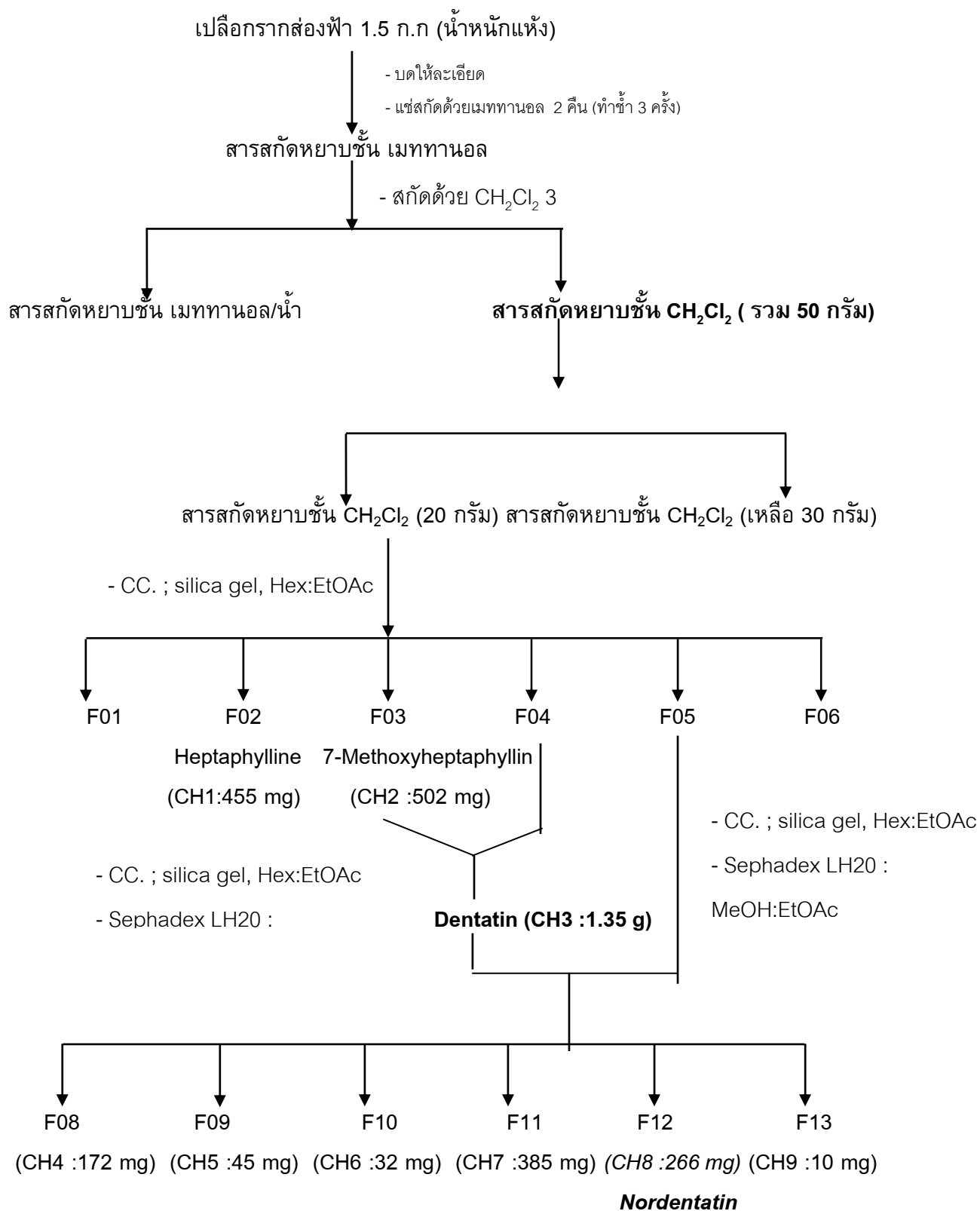
บทที่ 4 ผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างต้นสอ่งฟ้าที่พบกระจายทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างต้นสอ่งฟ้า จากจังหวัดกาฬสินธุ์ โดยนำตัวอย่างต้นสอ่งฟ้าแบ่งย่อยออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ ส่วนใบ ลำต้น และเปลือกราก จากนั้นนำมาทำการต้มสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ hexane dichloromethane และ methanol แต่ละตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ สุดท้ายจะได้สารสกัดหยาบทั้งสิ้น 9 ส่วนด้วยกัน จากนั้นนำสารสกัดหยาบทั้ง 9 ส่วนมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH โดยดูถึงความสามารถในการจับกับ DPPH radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร โดยสารดังกล่าวมีสีม่วง ในการทดลองหาสารสังเคราะห์สามารถจับกับ DPPH radical ได้สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองของ DPPH ซึ่งจะสามารถวัดค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ ได้ผลการทดลองดังแสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดลองฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากต้นสอ่งฟ้าด้วยวิธี DPPH assay

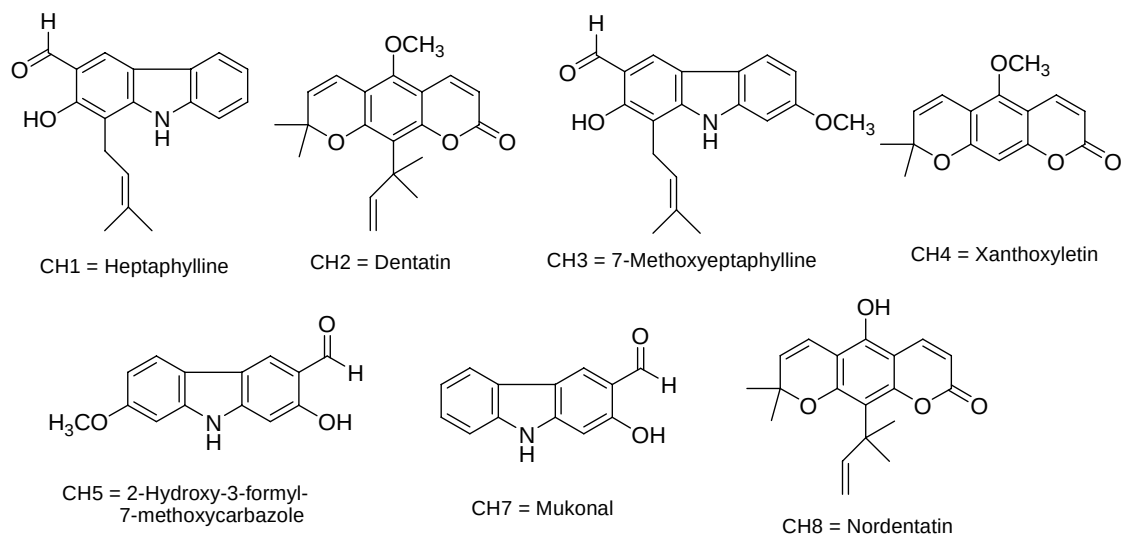
สารสกัด หยาบ	ใบ			ลำต้น			เปลือกราก		
	Hexane	CH ₂ Cl ₂	Methanol	Hexane	CH ₂ Cl ₂	Methanol	Hexane	CH ₂ Cl ₂	Methanol
IC ₅₀ (µg/mL)	852.8	352.5	53.8	872.3	527.5	300.0	88.3	178.9	511.4

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าส่วนของเปลือกราก และ ใบแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แต่ในส่วนของใบพบว่าชั้น methanol ซึ่งเป็นชั้นสารที่มีขี้วมักเป็นส่วนที่แสดงฤทธิ์ดี ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งสนใจในส่วนของสารสกัดจากส่วนของ เปลือกรากต้นสอ่งฟ้า จากการทดลองข้างต้นได้ทำการต้มสกัด พบว่าส่วนที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือส่วนของชั้น hexane แต่ในการทดลองต่อมาต้องทำการสกัดสารเป็นจำนวนมากจึงทำการแช่สกัด ดังนั้นจึงได้ใช้ Dichloromethane เป็นตัวแช่สกัดแทน ขั้นตอนจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างต้นสอ่งฟ้า โดยสามารถเก็บเปลือกรากต้นสอ่งฟ้ารวมน้ำหนักแห้งทั้งสิ้น 1.5 กิโลกรัม จากนั้นทำการแช่สกัดด้วย ตัวทำละลาย Dichloromethane เป็นเวลา 3 คืน รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกสุดท้ายได้สารสกัดหยาบ 50 กรัม ขณะนี้กำลังดำเนินการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Chromatography โดยใช้สารผสมระหว่าง hexane และ ethyl acetate เป็นตัวชะ ดังแสดงตามแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1. แสดงขั้นตอนการแช่สกัด และการแยกสกัดสารบริสุทธิ์ จากเปลือกกรากต้นสองฟ้า

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีสเปกโตรสโคปีและเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานแล้ว พบว่าสารที่แยกได้ในครั้งนี้ประกอบด้วย Dentatin, Nordentatin, Xanthoxyletin, Heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxycarbazole และ Mukonal ดังแสดงตามรูปที่ 2



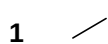
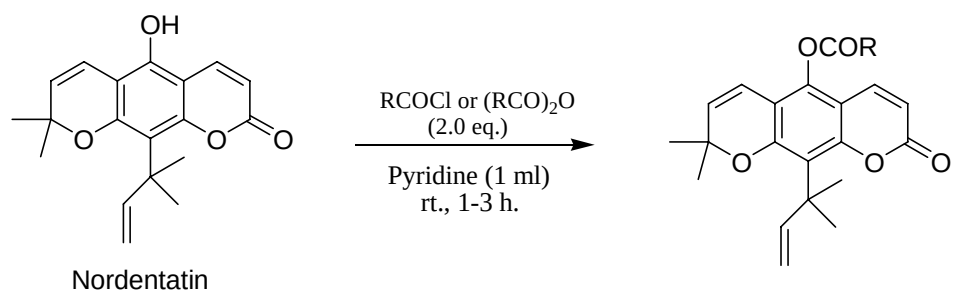
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกกรากต้นส่องฟ้าจากงานวิจัยครั้งนี้

การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี :

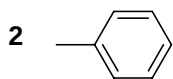
เบื้องต้นได้นำสาร nordentatin มาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีโดยการทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ ester ต่างๆ โดยสารทั้งหมดที่เตรียมได้สามารถปรับให้ใช้สภาวะเดียวกันคือการนำสาร nordenatin มาทำปฏิกิริยากับ acid chloride ต่างๆ โดยมี pyridine เป็นตัวทำละลายและเร่งปฏิกิริยาในเวลาเดียวกันด้วย จากนั้นสารละลายที่ได้จะนำมาสกัดด้วย 1N HCl, 5 % NaHCO₃ และ Brine ตามลำดับ จากนั้นจะทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วย column chromatography จะได้สารอนุพันธ์และปริมาณแต่ละตัว ตั้งแต่ 90-100 % ดังแสดงในรูปที่ 3 และอนุพันธ์ของสาร Nordentatin ทั้งหมดที่เตรียมได้ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี ด้วย NMR-spectroscopy ดังข้อมูลแสดงในภาคผนวก

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ :

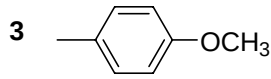
จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยวิธี DPPH และ TBAR ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2



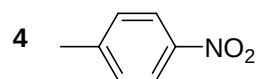
94.3 %



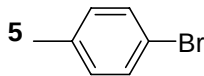
96.1 %



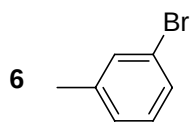
93.6 %



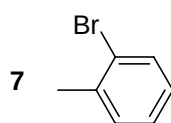
86.8 %



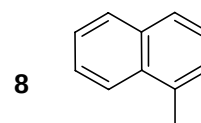
94.4 %



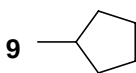
96.5 %



95.9 %

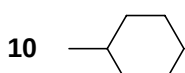


90.1 %

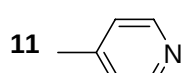


93.8 % (33.7 %)^a

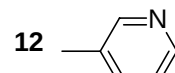
a = SM has impurity



98.9 %



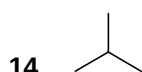
90.9 %



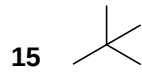
96.3 %



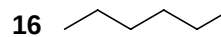
98.4 %



99.1 %



98.4 %



99.6 %

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ Nordentatin ที่เตรียมได้ทั้งหมด

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC_{50} ของสารที่แยกได้จากต้นสอ่งฟ้าและอนุพันธ์

compounds	DPPH assay IC_{50} (μ M)	TBAR assay (% inhibition at 500 μ M)	TBAR assay IC_{50} (μ M)
Heptaphylline	>1000	92.42	5.62
7-mehtoxy heptaphylline	810.74	76.58	1.98
Acetate Heptaphylline	264.86	93.20	4.55
Acetate 7-mehtoxy heptaphylline	915.00	84.05	4.22
Mukonal	>1000	ND	ND
2-hydroxy-3-formyl-7-methoxycarbazole	>1000	ND	ND
Xanthoxyletin	ND	71.36	166.01
Dentatin	>1000	37 % (1000 μ M)	ND
Nordentatin	84.32	95.83	1.69
1	ND	88.40	2.86
2	ND	28.00	>150
3	ND	48.48	ND
4	ND	95.98	4.30
5	ND	34.02	ND
6	ND	19.29	ND
7	ND	20.69	ND
8	ND	76.50	36.23
9	ND	87.90	10.61
10	ND	15.74	ND
11	ND	98.26	4.38
12	ND	97.60	3.81
13	ND	55.63	22.50
14	ND	57.49	9.50
15	ND	ND	ND
16	ND	57.11	7.83
Vit E	17.90	97.73	75.94

บทที่ 5 สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้ได้นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกรากต้นส่องฟ้ามาทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ TBA พบสาร Nordentatin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก โดยเทียบกับ วิตามิน อี ส่วนสาร Dentatin ซึ่งเป็น Methoxy-derivative ของ Nordentatin ไม่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH แต่มีฤทธิ์ค่อนข้างดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี TBAR ประกอบกับกระบวนการแยกสาร dentatin จากเปลือกรากต้นส่องฟ้าสามารถทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากและยังแยกได้ในปริมาณสูงคือ 0.24 % ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงพยายามที่จะเตรียมสารอนุพันธ์ใหม่ ของสาร Nordentatin เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารตั้งต้น โดยจะใช้สาร Nordentatin และ Dentatin เป็นสารตั้งต้นในการวิจัยครั้งนี้ จากผลการดำเนินงานผู้วิจัยได้นำเปลือกรากต้นส่องฟ้าปริมาณ 1.5 กิโลกรัม มาแช่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และผ่านขบวนการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ไรต์ ระเหยแห้ง ได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ไรต์ทั้งสิ้น 50 กรัม ในช่วงแรกของการดำเนินการได้นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ไรต์ 20 กรัม มาทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางโครมาโตกราฟี และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีและเทียบกับสารที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว พบว่าสามารถแยกสกัดได้สาร Dentatin, Nordentatin, Xanthoxyletin, Heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxycarbazole และ Mukonal โดยแยกได้สาร Dentatin 1.35 กรัม และสาร Nordentatin 266 มิลลิกรัมจากนั้นได้นำสาร Nordentatin มาเตรียมสารอนุพันธ์ ต่างๆ ในรูปของ ester โดยใช้สาร Nordentatin เป็นสารตั้งต้นในการปฏิกิริยากับ acid chloride ชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย pyridine ภายใต้สภาวะแห้งที่อุณหภูมิห้องสามารถเตรียมอนุพันธ์ได้ทั้งสิ้น 16 อนุพันธ์ และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการต้านฤทธิ์ไลโปเปอร์ออกซิเดชัน พบว่าสารตั้งต้น nordentatin มีฤทธิ์ต้านไลโปดีที่ดีที่สุด (IC_{50} 1.69 μM) รองลงมาคืออนุพันธ์ที่อยู่ในรูป ester ของ acetate (IC_{50} 2.86 μM) เมื่อทำให้เป็น ester ของ หมู่เบนซีน พบว่าฤทธิ์ลดลงแต่เมื่อวงแหวนมีการแทนที่ด้วยหมู่ NO_2 พบว่าฤทธิ์สูงกว่าการที่ไม่มีหมู่แทนที่ที่วงแหวน หรือแทนที่ด้วยหมู่ OCH_3 และพบว่าการเพิ่มขนาดหมู่วงแหวนให้ใหญ่ขึ้นฤทธิ์ลดลง แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นวงแหวน ชนิดที่เรียกว่า pyridine คือ nicotinoyl และ isonicotinoyl พบว่ามีฤทธิ์ดีกว่าวงแหวนชนิดเบนซีน นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มหมู่แทนที่ของ ester ให้เป็นสายที่ยาวขึ้น ฤทธิ์จะดีขึ้น และเมื่อทำเป็นสาขาฤทธิ์จะดีขึ้นเช่นกัน จากข้อมูลที่ได้ในงานวิจัยครั้งนี้จึงพบว่าสารต้นแบบคือ nordentatin มีศักยภาพสูงในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงอนุพันธ์ ที่ 1, 4, 11, 12, 14 และ 16 ดังที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงจะได้ทำการทดลองเพิ่มโดยการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพิ่มเพื่อศึกษาฤทธิ์อื่นๆ ต่อไป ขณะเดียวกันผู้วิจัยได้ร่วมมือกับ Prof. Naoki Saito ในการสังเคราะห์สาร nordentatin ขึ้นมาเพื่อให้มีสารตั้งต้นในปริมาณที่พอเพียงในการดัดแปลงโครงสร้างต่อไป ซึ่งขณะนี้สามารถสังเคราะห์สาร nordentatin ได้สำเร็จ (ดังแสดงในภาคผนวกที่ 3) ซึ่งคาดว่าจะสามารถพัฒนาหาอนุพันธ์ใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น เพื่อที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. โอภา วัชรคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ. พี. เอช. พรินท์ 190 หน้า.
2. เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้ 379 หน้า.
3. Wangboonskul, J., Pummangura, S., and Chaichantipyuth, C. Five coumarins and a carbazole alkaloid from the root bark of *Clausena harmandana*. *J. Nat. Pro.* 1984, 47 (6), 1058-1059.
4. Chaichantipyuth, C., Pummangura, S., Naowsaran, K., and Thanyavuthi, D. A two new bioactive carbazole alkaloids from the root bark of *Clausena harmandana*. *J. Nat. Pro.* 1988, 51 (6), 1285-1288.
5. Magiatis, P., Melliou, E., Skatsounis, A., Mitaku, S., Leonce, S., Renard, P., Pierre, A., and Atassi G. Synthesis and cytotoxic activity of pyranocoumarins of the Seselin and Xanthyletin series. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 982-986.
6. Yenjai, C., Sripontan, S., Sriprajun, P., Kittakoo, P., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M., and Thebtaranonth Y. Coumarins and Carbazoles with antipalmodial activity from *Clausena harmandiana*. *Planta Med.* 2000, 66, 277-279.
7. Lee, K-H., Chai, H-B., Tamez, P. A., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., Win, K. K., and Tim-Wa, M. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assmica*. *Phytochemistry.* 2003, 64, 535-541.
8. Sunthikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, W. J., Spande, F. T., Nimit, Y., and Rochanaruangrai, S. Coumarins and Carbazole from *Clausena excavata* exhibited antimycobacterial and antifungal activities. *Planta Med.* 2003, 69, 155-157.
9. Gopalakrishnan, G., Kasinath, V., Singh, N.D. P., Thirumurugan, R., Shanmuga Sundara Raj, S., and Shanmugam, G. A new rout to dihydrobenzopyran via tandem demethylation cyclization. *Moleculaes.* 2000, 5, 880-885.
10. Node, M., Nishide, K., Fuji, K., and Fujita, E. Hard acid and soft nucleophilic system. 2^1 demethylation of methyl ethers of alcohol and phenol with an aluminium halide-thiol system. *J. Org. Chem.* 1980, 45, 4275-4277.
11. Gunatilaska, A. A. L., and Kingston, D. G.I. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. *J. Nat. Prod.* 1994, 57(4), 518-520.
12. Dholalakia, V. N>, Parkekh, M. G., and Trivedi, K. N. Studies in 4-hydroxy coumarins. *Aust. J. Chem.* 1968, 21, 2345-7.

13. Godoy, F. P. M., Victor, R. S., Bellini, M. A., Guerreiro, G., Rocha, C. W., Bueno, C. O., Hebling, J. A. M., Bacci, M., Siva da, G. F. F., Viera, C. P., Fernandes, B. J., and Pagnocca C. F. *J. Braz. Inhibition of the symbiotic Fungus of Leaf-Cutting ants by coumarins. Chem. Soc.* 2005. 16(3B), 669-672.
14. Ito, C., Matsuoka, M., Oka, T., Ju-Ichi, M., Niwa, M., Omura, M., and Furukawa, H. New binary coumarins from *Citrus* plant. *Chem. Pharm. Bull.* 1990. 38(5), 1230-1232.
15. Valenti, P., Rampa, A., Budriesi, R., Bisi, A., and Chiarini, A. Coumarin 1,4-dihydropyridin derivatives. *Bio. Org. Med. Chem.* 1998, 6, 803-810.
16. Kostova, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem.* 2005, 5, 29-46.
17. Tyagi, Y. K., Kumar, A., Raj, H. G., Vohra, P., Gupta, G., Kumar, R., Kumar, P., and Gupta, R. K. Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methlocoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *Eur. Med. Chem.* 2005, 40, 413-420.
18. Su, C., Yeh, S.F., Liu, C.M., Damu, A.G., Kuo, T.H., Chiang, P.C., Bastow, K.F., Lee, K.H. and Wu, T.S. Anti-HBV and cytotoxic activity of pyranocoumarin derivatives. *Bioor. Med. Chem.* 2009, 17, 6137-6143.
19. Chan, Y.Y., Li, C.H., Shen, Y.C. and Wu, T.S. Anti-inflammatory principles from the stem and root barks of *Citrus medica*. *Chem. Pharm. Bull.* 2010, 58(1), 61-65.

ภาคผนวก

1

สัญญาเลขที่ MRG518017

โครงการ: การพัฒนาสาร Neuroprotective ชนิดใหม่กลุ่ม coumarins จากเปลือกรากต้นสองฟ้า

รายงานสรุปการเงินในรอบ ...24... เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : นางสาวเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึงวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2554

รายจ่าย					
หมวด	รายจ่ายสะสม	ค่าใช้จ่าย	รวมรายจ่าย	งบประมาณ	คงเหลือ
(ตามสัญญา)	จากรายงาน	งวดปัจจุบัน	สะสมจนถึง	รวมทั้งโครงการ	(หรือเกิน)
	ครั้งก่อน		งวดปัจจุบัน		
ค่าตอบแทน	120,000.....	60,000.....	180,000.....	240,000.....	60,000.....
ค่าจ้าง	-.....	-.....	-.....	-.....	-.....
ค่าวัสดุ	195,000.....	15,000.....	210,000.....	210,000.....	-.....
ค่าใช้สอย	25,000.....	5,000.....	30,000.....	30,000.....	-.....
ค่าครุภัณฑ์	-.....	-.....	-.....	-.....	-.....
รวม	340,000.....	80,000.....	420,000.....	480,000.....	60,000.....

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

เงินเดิม (การเปิดบัญชี)	100.00	บาท	เมื่อ 27 มีนาคม 2551
งวดที่ 1	240,000.00	บาท	เมื่อ 20 มิถุนายน 2551
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1	34.71	บาท	เมื่อ 25 มิถุนายน 2551
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 2	304.41	บาท	เมื่อ 25 ธันวาคม 2551
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 3	40.53	บาท	เมื่อ 25 มิถุนายน 2552
งวดที่ 2 (ครั้งที่ 1)	120,000.00	บาท	เมื่อ 5 สิงหาคม 2552
งวดที่ 2 (ครั้งที่ 2)	59,940.00	บาท	เมื่อ 13 สิงหาคม 2552
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 3	93.97	บาท	เมื่อ 25 ธันวาคม 2553

รวม 420,513.62 บาท ๐

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1 เป็นเงิน	240,000.00	บาท
งวดที่ 2 เป็นเงิน	160,000.00	บาท

ฯลฯ

รวม 420,000.00 บาท ๒

จำนวนเงินคงเหลือ ๐ - ๒ 513.62 บาท

นางสาวเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

นางพิกุล วิรักษ

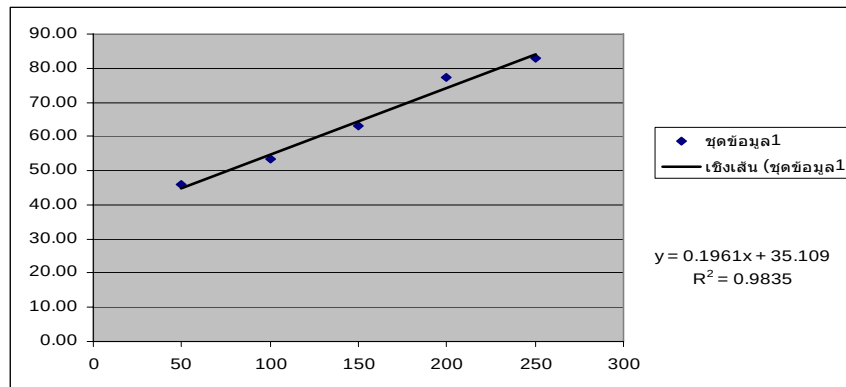
ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

ภาคผนวก

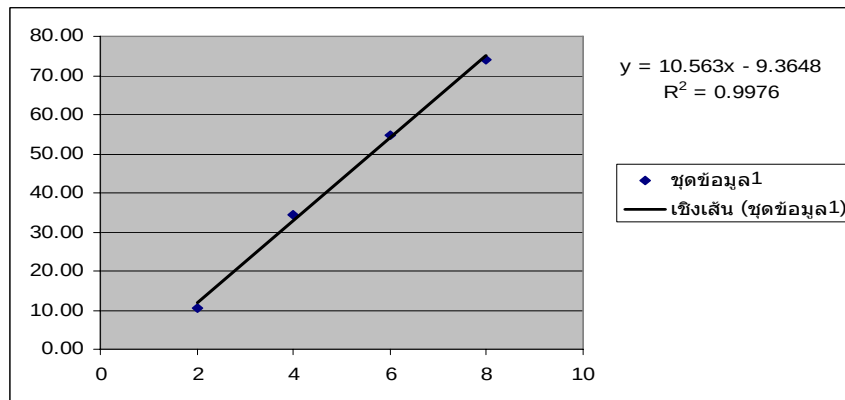
2

TBAR Assay

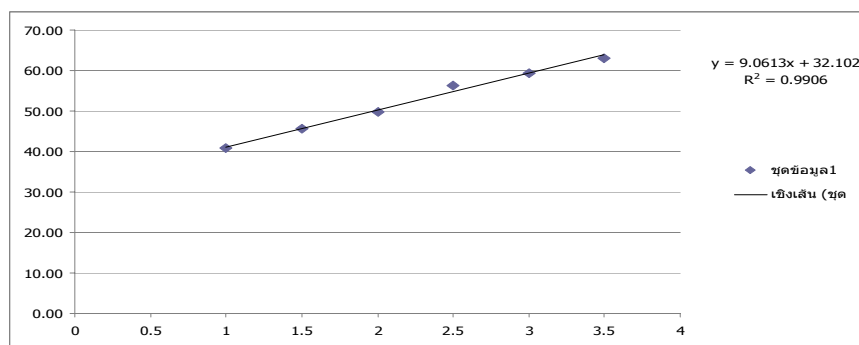
Vit E



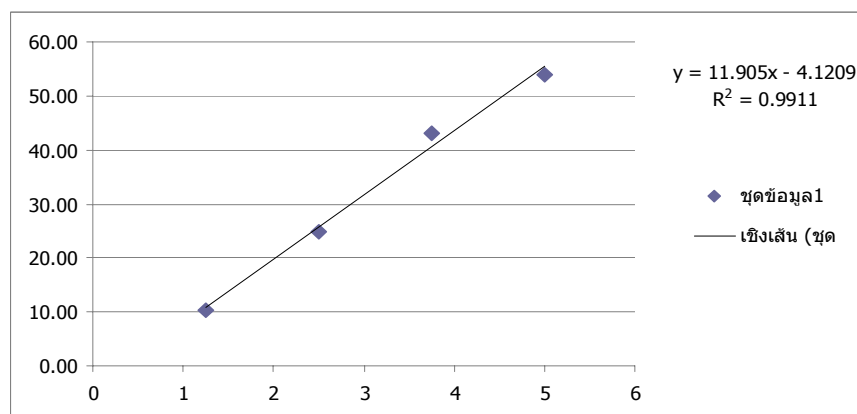
Heptaphylline



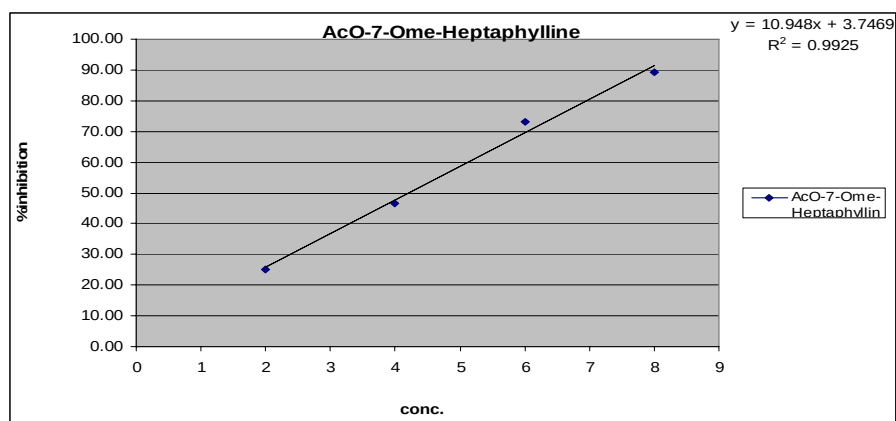
7-OMe Heptaphylline



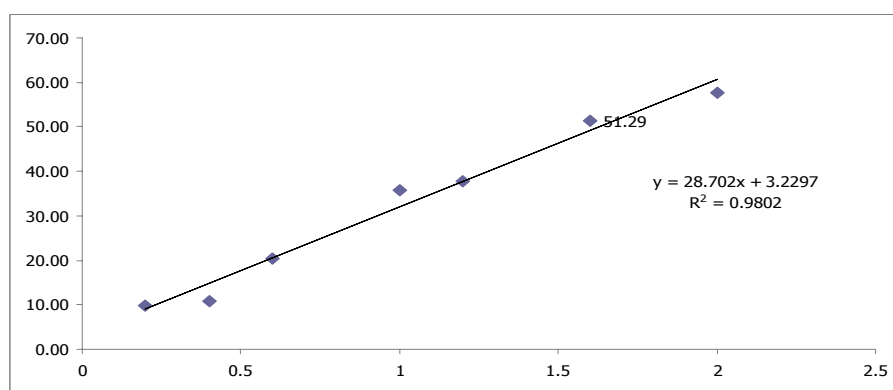
AcO-Heptaphylline



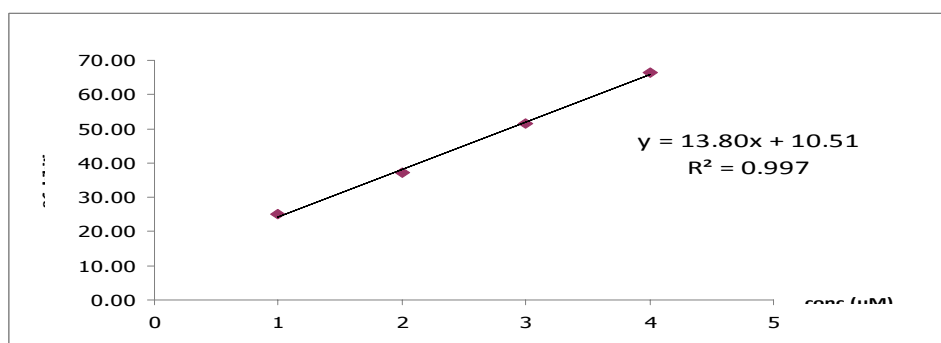
AcO-7-OMeHep



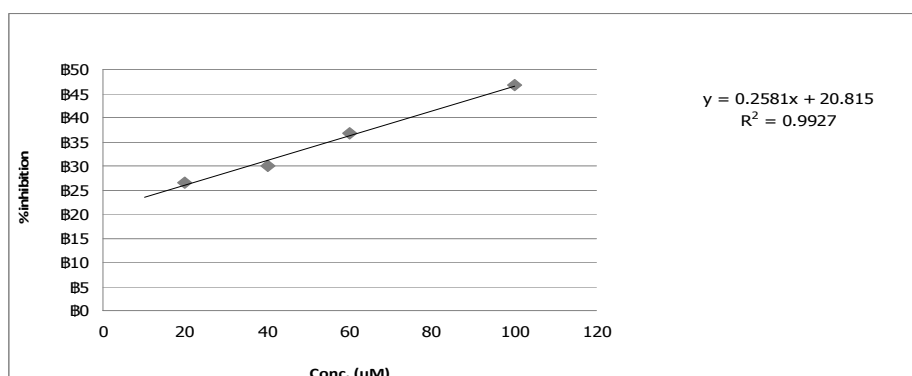
Nordentatin



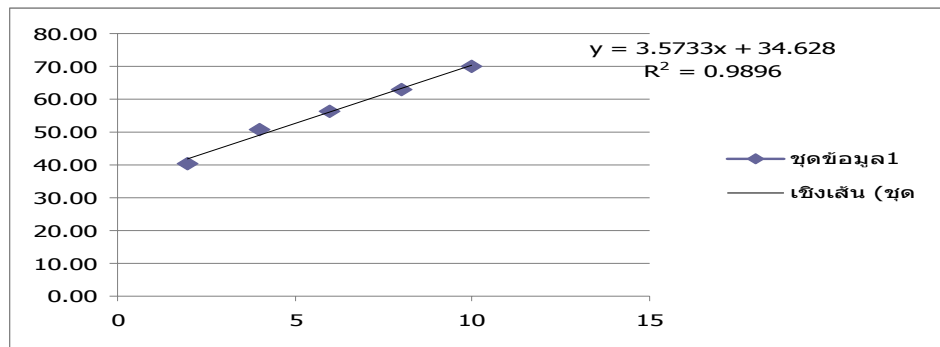
Cpd. 1



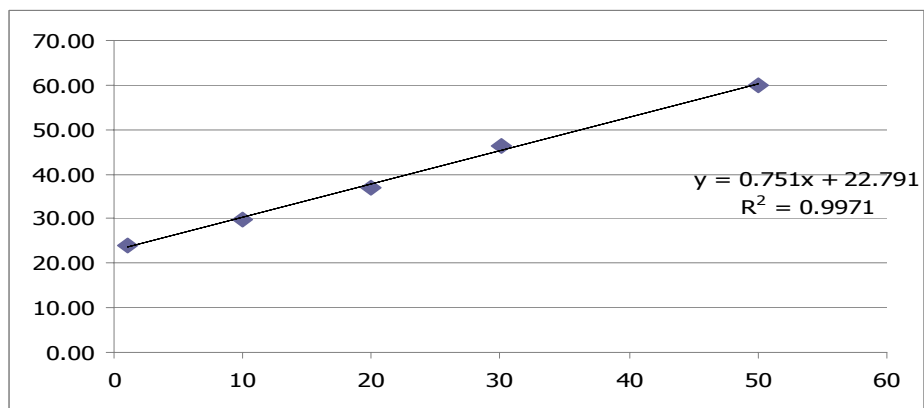
Cpd. 2



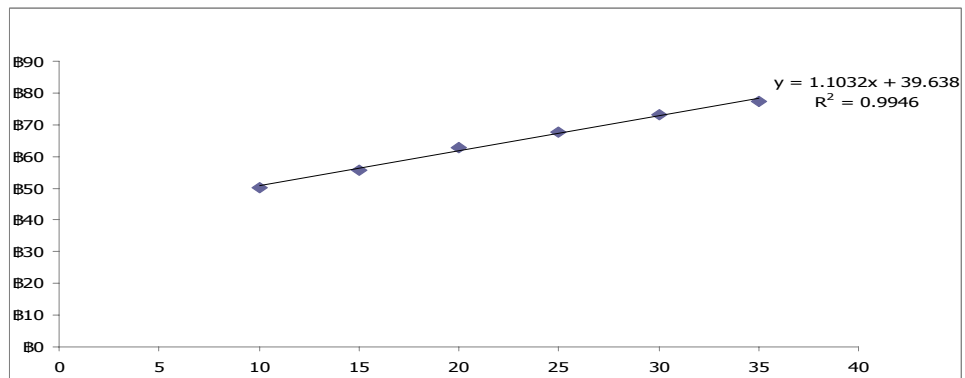
Cpd. 4



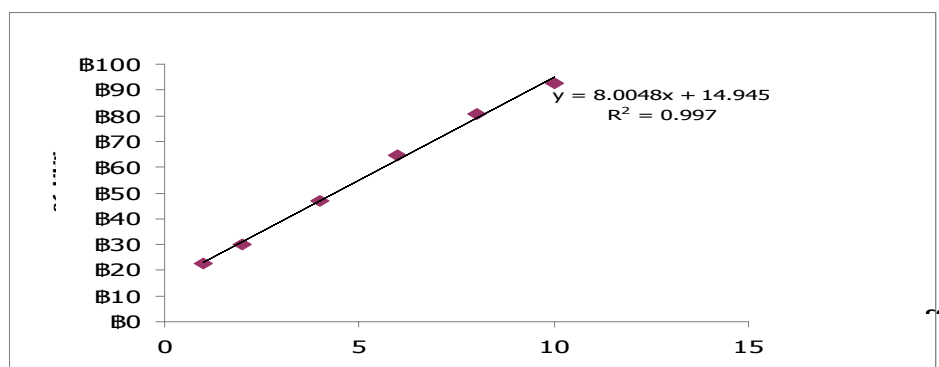
Cpd. 8



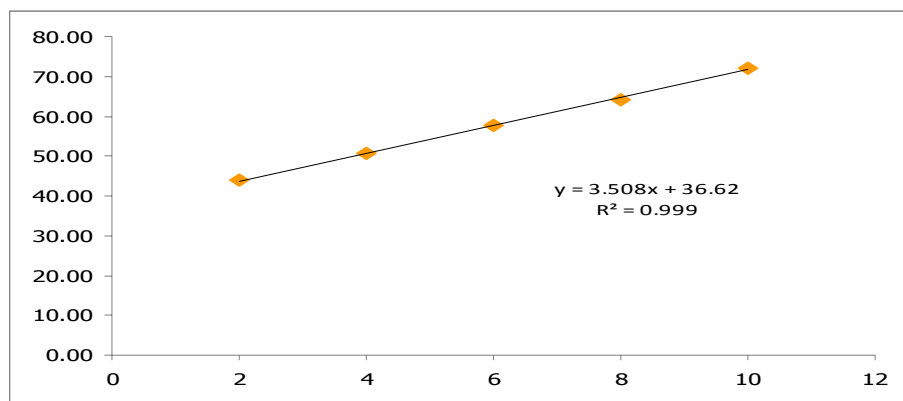
Cpd. 9



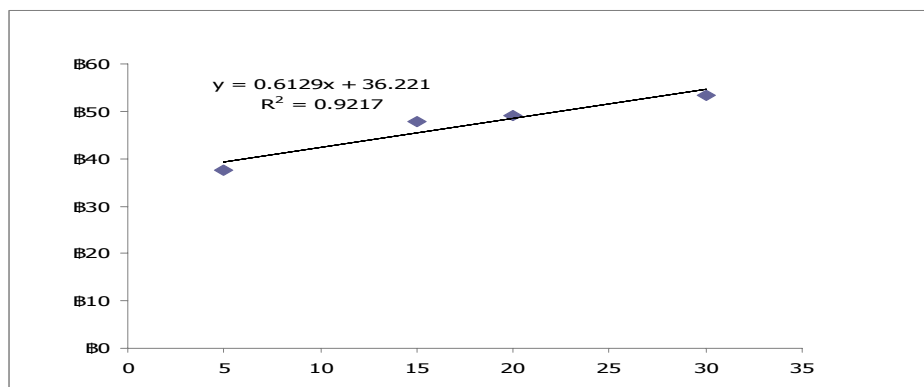
Cpd. 11



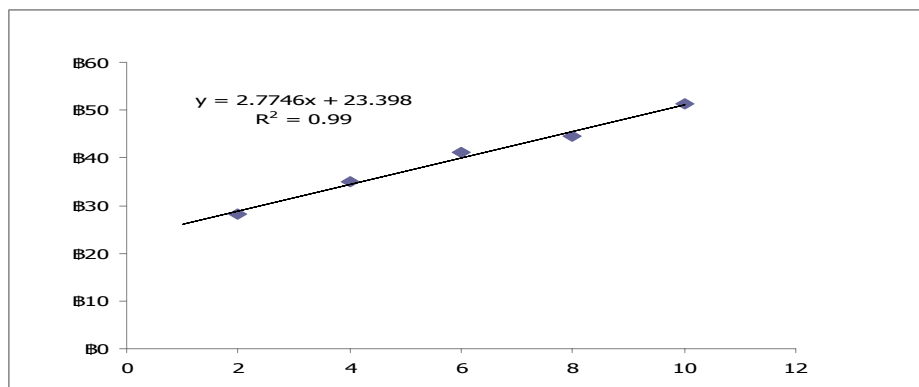
Cpd. 12



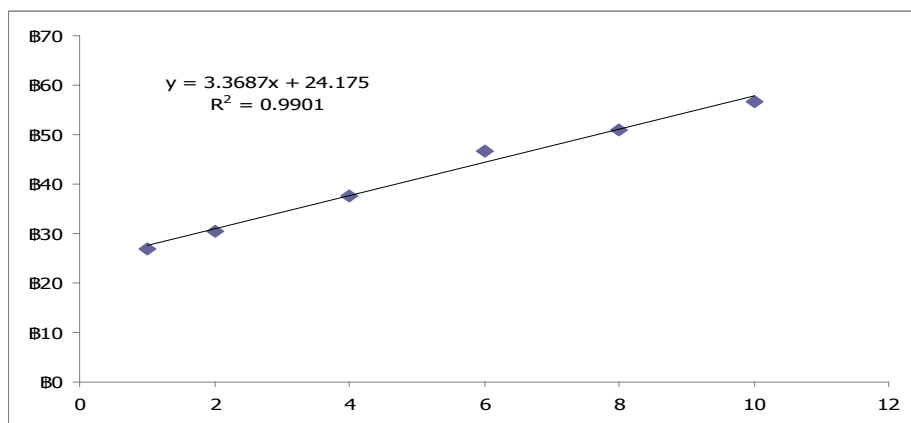
Cpd. 13



Cpd. 14



Cpd. 16



ภาคผนวก 3

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. **Puthongking P.**, Jantakoon P., Bootchan T., Mari T., Yokoya M., Saito N. and Patarapanich C.
“Antilipid peroxidation of bioactive compounds and derivatives from Thai medicinal plant, *Clausena Harmandiana*” The 9st NRCT-JSPS Joint seminar. December 7-9, 2010, Bangkok, Thailand.
2. Mari T., **Puthongking P.**, Yokoya M., and Saito N. “Preparation and biological activities of nordentatin derivatives” The 9st NRCT-JSPS Joint seminar. December 7-9, 2010, Bangkok, Thailand.
3. **Puthongking P.** and Noytong S. “Antilipid peroxidation activity of carbazole alkaloids and its derivatives from Thai medicinal plant, *Clausena Harmandiana*” International conference on Folk and Herbal medicine. November 25-28, 2010, Udaipur(Rajasthan), India.
4. **Puthongking P** and Yusakul G. “Coumarins and carbazole with antioxidant activity from *Clausena Harmandiana*” The 22nd Federation of Asia Pharmaceutical Association congress Translation Research. November 7-10, 2008, Singapore.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ขณะนี้กำลังเตรียม manuscript สำหรับตีพิมพ์ในระดับนานาชาติโดยจะรวมเนื้อหาทั้งวิธีการสังเคราะห์สาร nordentatine ด้วยวิธีทางเคมี และการแยกสารสำคัญจากธรรมชาติ รวมถึงผลการต้านไลโปเปอร์ออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านมะเร็งซึ่งรอผลการทดสอบจากประเทศญี่ปุ่น (ส่งทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ประเทศญี่ปุ่น)

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- การฝึกอบรมเรื่อง การพัฒนาสาร Neuroprotective ชนิดใหม่กลุ่ม coumarins จากเปลือกกรากต้น ส่องฟ้า ณ ประเทศญี่ปุ่น ด้วย ทุน Thai visiting scholarship 2552 (แหล่งทุน มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

- ได้มีการนำงานวิจัยดังกล่าวมาพัฒนาการเรียนการสอนโดยให้เป็นหัวข้อวิทยานิพนธ์แก่นักศึกษาระดับปริญญาโทจำนวน 2 เรื่อง เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้งานวิจัย และเป็นหัวข้อโครงงานปัญหาพิเศษในระดับปริญญาตรี จำนวน 2 เรื่องดังนี้

- ได้เป็นหัวข้อวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท 2 เรื่อง คือ

1) นายพงศกร จันทะคุณ ซึ่งจะทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เพิ่มเติมและศึกษาฤทธิ์การเป็น neuroprotective agent โดยใช้เซลล์ P19 (กำลังดำเนินการ โดยเริ่มดำเนินการเมื่อ มิถุนายน 2553)

2) Miss Mari Tatsukawa จาก Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan ซึ่งจะศึกษาวิธีการสังเคราะห์ nordentatin (กำลังดำเนินการ โดยเริ่มดำเนินการเมื่อ เมษายน 2553)

- ได้เป็นหัวข้อโครงการพิเศษระดับปริญญาตรี 2 เรื่อง คือ

1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่ม coumarin จากเปลือรรากต้นสอ่งฟ้า โดยนายพงศกร จันทะคุณ และนาย ชีรภัทร บุตรจันทร์ แล้วเสร็จเมื่อ เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552

2) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่ม carbazoleต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยนายทรงกลด น้อยตั้ง แล้วเสร็จเมื่อ เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2553