



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลต้นสาธร  
และเปลือกต้นเลือดแรด

โดย ดร. อุไรวรรณ ศรีพนา

เมษายน 2561

สัญญาเลขที่ MRG5980241

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลต้นสาธร  
และเปลือกต้นเลือดแรด

ผู้วิจัย

สังกัด

ดร. อุไรวรรณ ศรีพนา      มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด  
รศ. ดร. จวี เย็นใจ      มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลต้นสาธรและเปลือกต้นเลียดแรด สำเร็จได้ด้วยดีผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. ณวี เย็นใจ อาจารย์ประจำ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การแนะนำ ช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ระหว่างการทำวิจัยรวมทั้งความช่วยเหลือด้านอื่นๆ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ทำให้ผู้วิจัยมีประสบการณ์เพิ่มมากขึ้นรวมทั้ง ได้รับโอกาสพบปะนักวิจัยอาวุโส ทำให้ได้รับแรงบันดาลใจและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ เพื่อการทำงานวิจัยให้ประสบผลสำเร็จ

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ดที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานบางส่วน

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือทางเทคนิคสเปกโทรสโกปี

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่ให้การสนับสนุนในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณนักศึกษาระดับปริญญาตรี ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยที่ช่วยทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

อุไรวรรณ ศรีพนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

2561

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **MRG5980241**

ชื่อโครงการ: **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลต้นสาธรและเปลือกต้นเลือดแรด**

ชื่อนักวิจัย: **ดร. อุไรวรรณ ศรีพนา มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด**  
**รศ. ดร. จวี เย็นใจ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**

อีเมล: **uraiwan\_s49@yahoo.com**

ระยะเวลาโครงการ: **2 ปี (2 พฤษภาคม 2559 – 1 พฤษภาคม 2561)**

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลต้นสาธรและจากเปลือกของต้นเลือดแรด สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 13 สาร โดยแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้จากต้นสาธรทั้งหมด 8 สาร (A-H) ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานโครงสร้างแล้วและจากเปลือกต้นเลือดแรดแยกสารได้ทั้งหมด 5 สาร (I-M) โครงสร้างของสารทั้งหมดวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเช่น 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR และ DEPT) และ 2D NMR (HMQC, HMBC, COSY และ NOESY) สารบริสุทธิ์ทั้งหมดจากผลต้นสาธรนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB (มะเร็งช่องปาก) MCF-7 (มะเร็งเต้านม) NCI-H187 (มะเร็งปอด) และเซลล์ปกติ (Vero cells) พบว่าสาร **A** แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 ด้วยค่า  $\text{IC}_{50} = 50.93 \mu\text{M}$  และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ส่วนสาร **B** แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, NCI-H187 และ Vero cells ด้วยค่า  $\text{IC}_{50} = 63.64, 114.44$  และ  $28.44 \mu\text{M}$  ตามลำดับ และสาร **H** แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ด้วยค่า  $\text{IC}_{50} = 110.23 \mu\text{M}$

คำหลัก : สาธร, เลือดแรด; ความเป็นพิษต่อเซลล์; มะเร็งช่องปาก; มะเร็งเต้านม; มะเร็งปอด

**Abstract**

---

**Project Code :** MRG5980241**Project Title :** Bioactive Constituents from the Fruits of *Millettia leucantha* and the Stem Barks of *Knema globularia* (Lam.) Warb**Investigators :** Dr. Uraiwan Sripahana      Roi Et Rajabhat University  
Assoc. Prof. Dr. Chavi Yenjai      Khon Kaen University**E-mail Address :** uraiwan\_s49@yahoo.com**Project Period :** 2 years (2 May 2016 – 1 May 2018)

The chemical constituents from the fruits of *Millettia leucantha* and stem barks of *Knema globularia* (Lam.) Warb gave 13 compounds. Eight known flavonoids (**A-H**) from *M. leucantha* Kurz and five compounds (**I-M**) from *K. globularia* (Lam.) Warb were isolated. All structures were elucidated on the basis of 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR and DEPT) and 2D NMR (HMQC, HMBC, COSY and NOESY) techniques. All isolated compounds were evaluated for their cytotoxic abilities against three human cancer cell lines, including KB (oral human epidermal carcinoma), MCF-7 (breast cancer), NCI-H187 (human small cell lung cancer) and the Vero cell line (African green monkey kidney). Compound **A** exhibited moderate cytotoxic activity against the MCF-7 cell line with an  $\text{IC}_{50}$  value of 50.93  $\mu\text{M}$  while this compound showed no cytotoxicity against Vero cells. Compound **B** exhibited cytotoxicity against KB, NCI-H187 and Vero cell lines with  $\text{IC}_{50}$  values of 63.64, 114.44 and 28.44  $\mu\text{M}$ , respectively. Compound **H** showed weak cytotoxicity against KB cells with an  $\text{IC}_{50}$  value of 110.23  $\mu\text{M}$ .

**Keywords :** *Millettia leucantha*, *Knema globularia*; cytotoxicity; KB; MCF-7; NCI-H187

## บทสรุปโครงการ

งานวิจัยเรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลต้นสาหร่ายและเปลือกต้นเลือดแรดมุ่งเน้นการสกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้มาวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 13 สาร ประกอบด้วยสารที่แยกได้จากต้นสาหร่าย 8 สาร (A-H) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์กลุ่มฟลาโวนอยด์และเคยมีการรายงานโครงสร้างแล้ว และการแยกสารบริสุทธิ์จากต้นเลือดแรด 5 สาร เป็นสารใหม่ 1 สาร (K) และสารเคยรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สาร (I-J และ L-M) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นสาหร่ายไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด KB (มะเร็งช่องปาก) MCF-7 (มะเร็งเต้านม) NCI-H187 (มะเร็งปอด) และเซลล์ปกติ (Vero cells)

## รายละเอียดผลการดำเนินการของโครงการ

### 1. บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์โรคมะเร็งในประเทศไทยปัจจุบันยังถือว่าเป็นห่วง จำนวนผู้ป่วยมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอด 20 ปีที่ผ่านมา และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของคนไทย พบว่าคนไทยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งกว่า 60,000 คนต่อปี ขณะที่มียารายงานการเสียชีวิตปีละเกือบ 8 ล้านคนทั่วโลก โดยโรคมะเร็งที่พบมาก 5 อันดับแรกในเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ใหญ่ ส่วนโรคมะเร็งที่พบมาก 5 อันดับแรกในเพศชาย ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งเม็ดเลือดขาว และมีแนวโน้มที่จำนวนผู้ป่วยมะเร็งจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกในร่างกาย เช่น สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหาร อากาศ เครื่องดื่ม รวมถึงการได้รับรังสี เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย และพยาธิบางชนิด และปัจจัยจากภายในร่างกาย เช่น ความผิดปกติทางพันธุกรรม ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันและภาวะทุพโภชนา

การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งมีหลายวิธีและบางวิธีรักษาโดยการฉายา ซึ่งพบว่ายาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ยังไม่สามารถรักษาได้ครอบคลุมได้ทุกชนิดของโรคในผู้ป่วย อีกทั้งยังพบการดื้อต่อยา มีพิษข้างเคียง และเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงส่งผลกระทบต่อสังคมและเศรษฐกิจโดยรวม และเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาประเทศ ดังนั้นการศึกษาและการวิจัยสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรไทยเพื่อพัฒนาเป็นตัวยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงแต่มีพิษและฤทธิ์ข้างเคียงน้อย จึงยังมีความน่าสนใจ

ต้นสาหร่าย<sup>[1]</sup> (*Millettia leucantha* Kurz) เป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Millettia* มีการพบประมาณ 200 ชนิด โดยพบทั่วไปในเขตร้อนทั้งแอฟริกา เอเชียและออสเตรเลีย<sup>[2-3]</sup> โดยต้นสาหร่ายอยู่ในวงศ์ Leguminosae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นสาหร่ายเป็นไม้ที่พบขึ้นในป่าเบญจพรรณใกล้แหล่งน้ำทั่วไป เป็นไม้ต้นขนาดกลางผลัดใบ สูง

18-20 เมตร เรือนยอดกลมหรือทรงกระบอก เปลือกต้นสีเทาเรียบหรือแตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ ดินๆ เนื้อไม้สีขาวอมน้ำตาล แก่นสีน้ำตาลอมดำ เรือนยอดเป็นพุ่มทึบ ใบอ่อนและยอดอ่อนมีขนยาวอ่อนนุ่มคล้ายเส้นไหมปกคลุมอยู่ ใบเป็นใบประกอบรูปขนนกเรียงสลับ ใบย่อยติดเป็นคู่ตรงกันข้าม 3-5 คู่ ปลายสุดเป็นใบเดี่ยวแผ่นใบย่อย รูปรีกว้าง 3-5.5 เซนติเมตร ยาว 5-12 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนมน ด้านล่างใบสีอ่อนกว่าด้านบน ใบแก่เกลี้ยง ดอกออกเป็นช่อกระจายแยกแขนงสีขาว ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร ออกพร้อมใบอ่อน รูปดอกถั่ว กลีบดอก 5 กลีบ กลีบเลี้ยง 4 กลีบติดกันเป็นหลอดสั้น ออกรวมกันเป็นช่อตามง่ามใบและปลายกิ่ง ออกดอกช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ผลเป็นฝักแบน รูปขอบขนานคล้ายฝักมีด มีเปลือกแข็ง กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ยาว 4-10 เซนติเมตร ฝักแก่แตกเป็น 2 ซีก ฝักหนึ่งๆ มี 1-3 เมล็ด เมล็ดสีน้ำตาล รูปร่างแบนคล้ายโล่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.3 เซนติเมตร ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด (รูปที่ 1) การนำไปใช้ประโยชน์โดยใช้ในการก่อสร้าง ใช้ทำเครื่องเรือน และด้ามเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ สำหรับตัวอย่างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสกุล *Millettia* พบว่าเป็นแหล่งของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์<sup>[4-9]</sup>



รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสาร

ต้นเลื้อยเรด<sup>[10]</sup> เป็นพืชในวงศ์ Myristicaceae สกุล *Knema* พบในป่าดิบของประเทศไทยพบประมาณ 12 ชนิด ลักษณะทางกายภาพเป็นไม้ยืนต้น ที่มีความสูงของต้นประมาณ 10-25 เมตร และอาจสูงได้ถึง 30 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มทรงสูงถึงค่อนข้างกลม เปลือกลำต้นแตกเป็นสะเก็ด เปลือกด้านนอกเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทาเข้ม ส่วนเปลือกด้านในเป็นสีชมพู ที่ยอดอ่อน ใบอ่อน และช่อดอกมีสะเก็ดเป็นขุยสีน้ำตาล ผลเป็นรูปทรงกลม



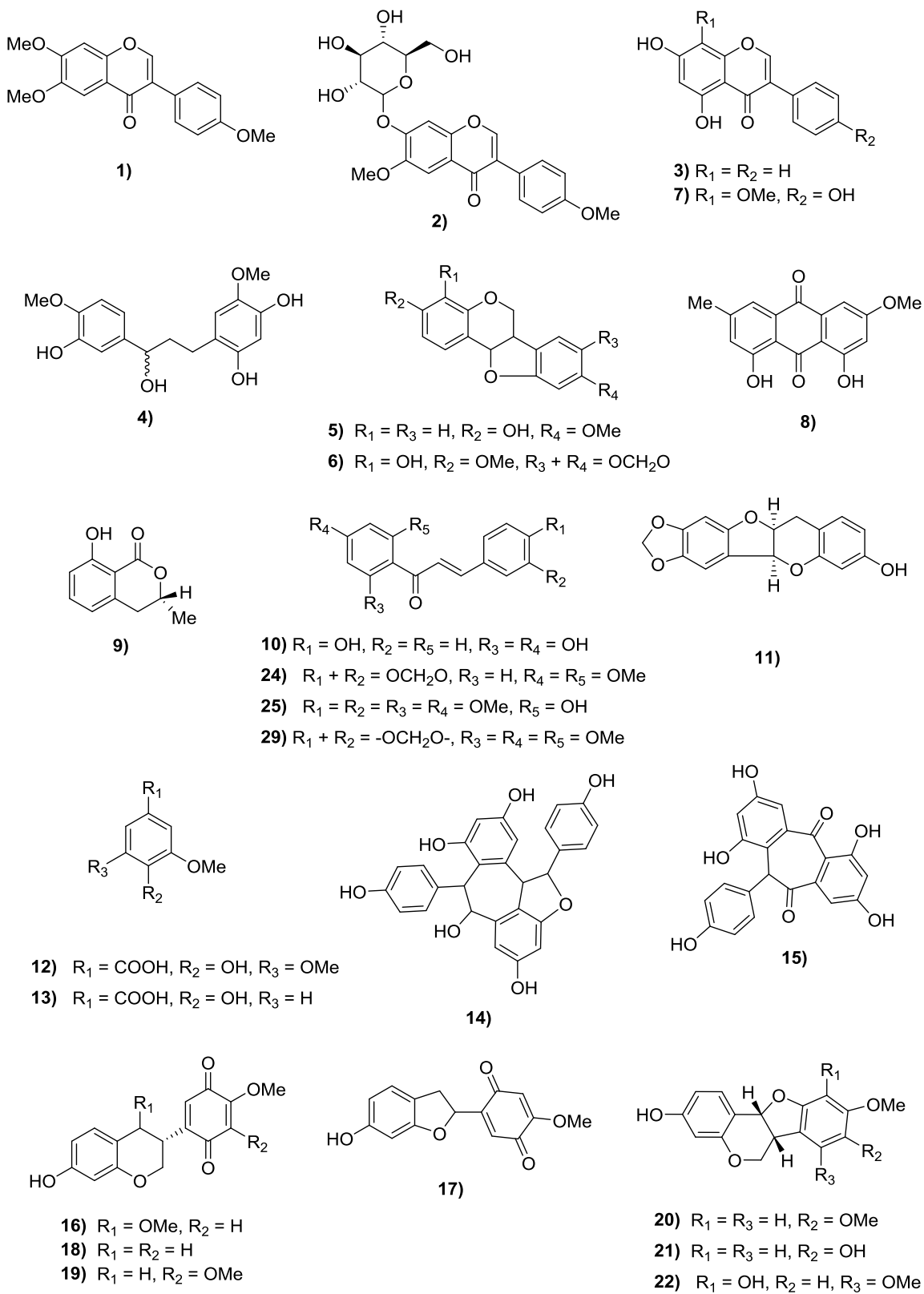
ในปี ค.ศ. 2014 Derese S. และคณะ<sup>[13]</sup> รายงานการแยกสารบริสุทธิ์จากเปลือกรากต้นสาธร พบสารทั้งหมด 3 สารคือ afrormosin (1), wistin (2) และ chrysin (3)

ในปี ค.ศ. 2011 Rayanil K และคณะ<sup>[8]</sup> รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากต้นสาธร พบสารใหม่ 1 สารคือ millettinol (4) และสารที่เคยรายงานโครงสร้างแล้ว 6 สารคือ medicarpin (5), 4-hydroxy-3-methoxy-8,9-methylenedioxypterocarpan (6), 5,4'-dihydroxy-7,8-dimethoxy-isoflavone (7), physcion (8), (R)-(-)-mellein (9) และ isoliquiritigenin (10) นำสาร 4, 5, 6 และ 8 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187, BCA-1 และ KB พบว่าสาร 4 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด BCA-1 ด้วยค่า  $IC_{50} = 3.44 \mu\text{g/mL}$

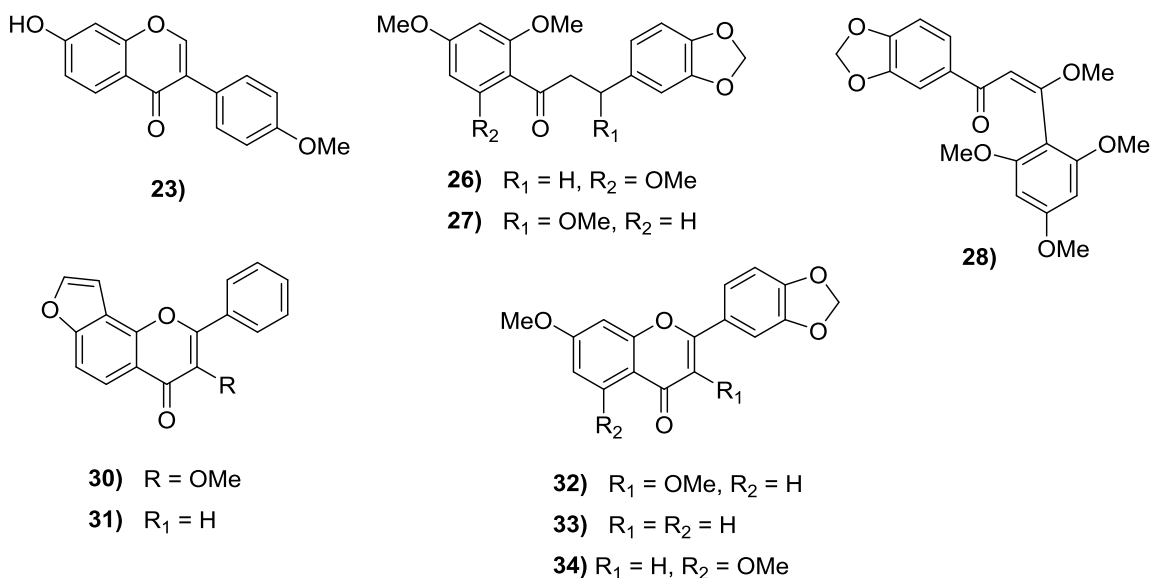
ในปี ค.ศ. 2010 Chatsumpun M และคณะ<sup>[9]</sup> รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากต้นสาธร พบสารทั้งหมด 5 สารคือ (-)-maackiain (11), syringic acid (12), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (13), (-)-balanocarpol (14) และ (+)-diptoinonesin D (15)

ในปี ค.ศ. 2006 Takahashi M และคณะ<sup>[14]</sup> รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากต้นสาธร พบสารใหม่ 2 สารคือ millettione A (16) และ millettione B (17) และสารที่เคยรายงานโครงสร้างแล้ว 6 สารคือ 3R-claussequinone (18), pendulone (19), secundiflorol I (20), 3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan (21), 3,10-dihydroxy-7,9-dimethoxypterocarpan (22) และ formononetin (23) พบว่าสาร pendulone (19) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง leishmanicidal ด้วยค่า  $IC_{50} = 0.7 \mu\text{g/mL}$

ในปี ค.ศ. 2003 Phrutivorapongkul A และคณะ<sup>[15]</sup> รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกต้นสาธร พบสารอนุพันธ์กลุ่มชาโคนทั้งหมด 6 สารคือ 2',4'-dimethoxy-3,4-methylenedioxychalcone (24), 2'-hydroxy-3,4,4',6'-tetramethoxy-chalcone (25), 2',4',6'-trimethoxy-3,4-methylenedioxydihydrochalcone (26), dihydromillettone methyl ether (27), 2,4,6,β-tetramethoxy-3',4'-methylenedioxychalcone (28) และ 2',4',6'-trimethoxy-3,4-methylenedioxychalcone (29) และสารฟลาโวนทั้งหมด 5 สารคือ karanjin (30), lanceolatin B (31), desmethoxykanugin (32), 3',4'-methylenedioxy-7-methoxyflavone (33) และ 3',4'-methylenedioxy-5,7-dimethoxyflavone (34)



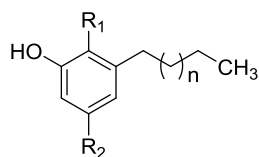
รูปที่ 3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นสาร



### รูปที่ 3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นสาธร (ต่อ)

จากการสืบค้นฐานข้อมูล Scifinder Scholars database 2017 พบว่ามีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเลือดแรด ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 4) โดยในปี ค.ศ. 2016 คณะผู้วิจัย<sup>[12]</sup> รายงานการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเหงาจากต้นเลือดแรด พบสารใหม่กลุ่ม diaryloctanes 2 สารคือ kneglobularic acid A (**35**) และ kneglobularic acid B (**36**) และรายงานสารใหม่กลุ่ม acetophenone 1 สารคือ kneglobularone A (**37**) และสารที่เคยรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สารคือ 3-(12-phenyldodecyl)-phenol (**38**), 3- undecylphenol (**39**), 6-tridecylsalicylic acid (**40**) และ kneglomeratanone A (**41**) เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, MCF-7, NCI-H187 และ Vero cells พบว่าสาร **37** มีฤทธิ์ปานกลางในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187, KB และ Vero cell lines ด้วยค่า  $IC_{50} = 8.23-13.07 \mu g/mL$

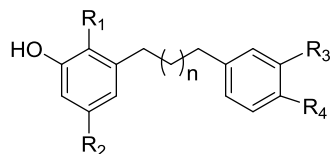
ในปี ค.ศ. 2000 Mei W. และคณะ<sup>[16]</sup> รายงานการพบสารอนุพันธ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ประกอบด้วย kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**42**) และ quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**43**) และในปี 2002<sup>[17]</sup> มีการรายงานการแยกสารบริสุทธิ์เพิ่มเติมอีก 8 สาร ประกอบด้วย taxifolin (**44**), luteolin (**45**), catechin (**46**), sulfuretin (**47**), proanthocyanidin (**48**), 7-megastigmen-3,6,9-triol (**49**),  $\beta$ -sitosterol (**50**), และ daucosterol (**51**)



37)  $R_1 = \text{COCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $n = 8$

39)  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ,  $n = 8$

40)  $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $n = 10$

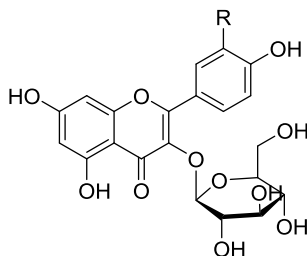


35)  $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $n = 6$

36)  $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = R_4 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $n = 6$

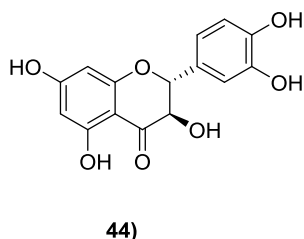
38)  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $n = 10$

41)  $R_1 = \text{COCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $n = 6$

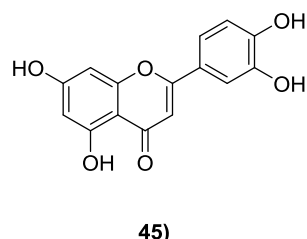


42)  $R = \text{H}$

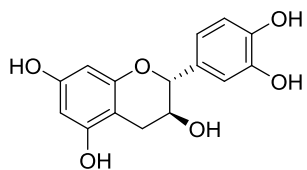
43)  $R = \text{OH}$



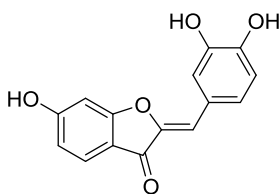
44)



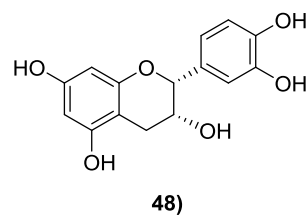
45)



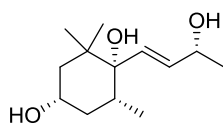
46)



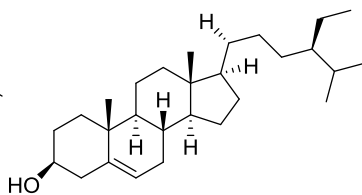
47)



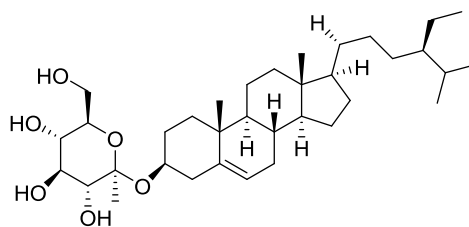
48)



49)



50)



51)

รูปที่ 4 ตัวอย่างสารประกอบที่แยกได้จากต้นเลื้อดแรด

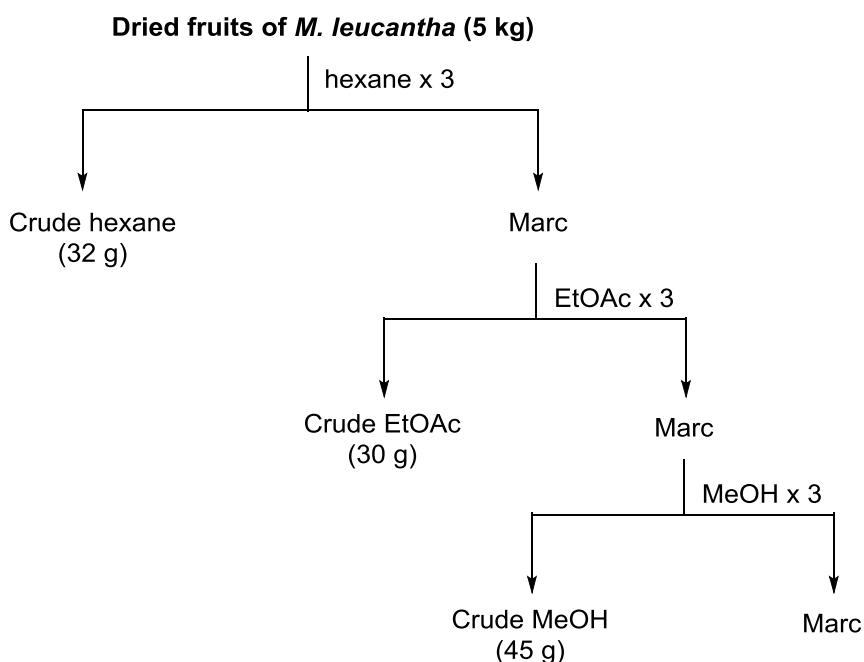
## 2 วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อแยกสารบริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์จากผลต้นสาร (Milletia leucantha Kurz) และเปลือกต้นเลื้อดแรด (Knema globularia (Lam.) Warb)
- 2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

### 3. วิธีการทดลองและวิจารณ์ผล

#### 3.1 การสกัดสารจากผลต้นสาธร

นำส่วนของต้นสาธร (*M. leucantha* Kurz) มาสับ ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดชั่งน้ำหนักได้ 5 กิโลกรัม นำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน พร้อมทั้งคนอย่างสม่ำเสมอ นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane) น้ำหนัก 32 กรัม แยกกากที่เหลือด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Crude EtOAc) น้ำหนัก 30 กรัม แยกกากที่เหลือด้วยตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอล (Crude MeOH) น้ำหนัก 45 กรัม (รูปที่ 5)

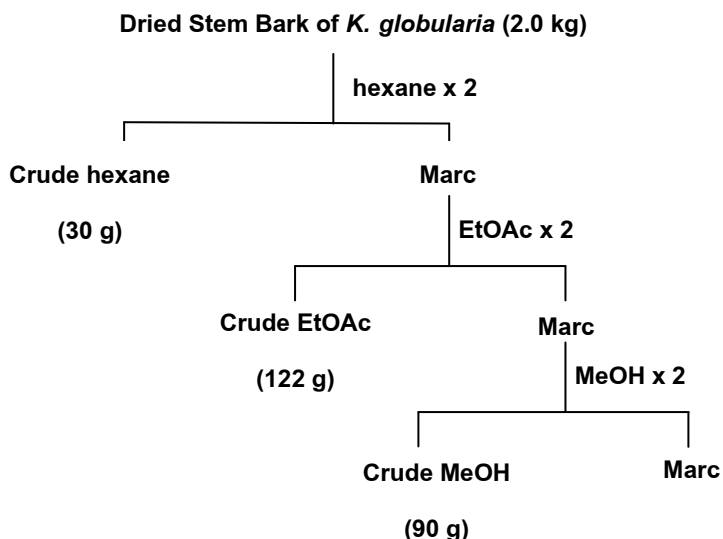


รูปที่ 5 แผนผังการสกัดผลของต้นสาธร

#### 3.2 การสกัดสารจากเปลือกต้นเลือดแรด

นำเปลือกต้นเลือดแรด (*K globularia*) มาสับ ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดชั่งน้ำหนักได้ 2.0 กิโลกรัม นำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน จำนวน 3 ลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน พร้อมทั้งคนอย่างสม่ำเสมอ นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane) น้ำหนัก 30 กรัม แยกกากที่เหลือด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต จำนวน 3 ลิตร 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต

(Crude EtOAc) น้ำหนัก 122 กรัม แยกกากที่เหลือด้วยตัวทำละลายเมทานอล จำนวน 3 ลิตร 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอล (Crude MeOH) น้ำหนัก 90 กรัม (รูปที่ 6)

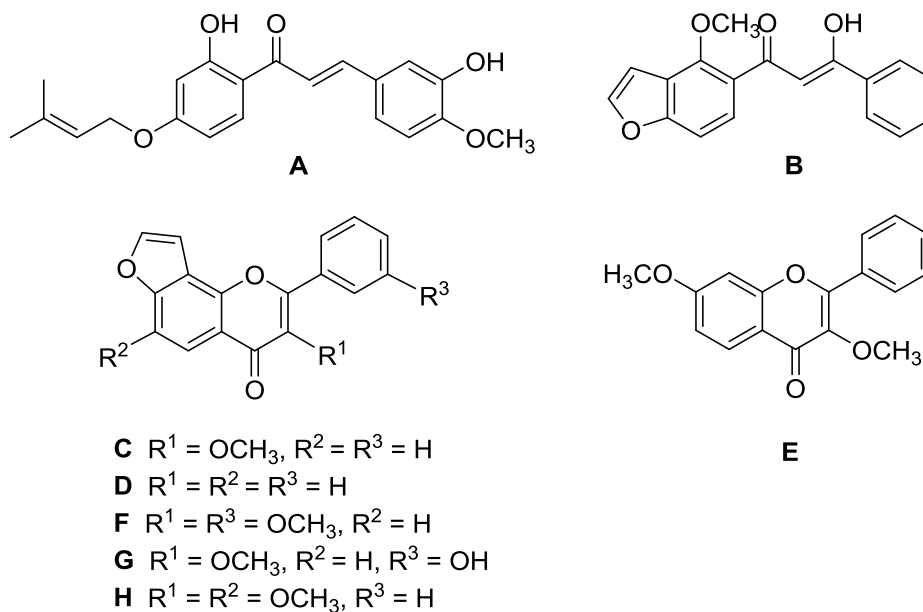


รูปที่ 6 แผนผังการสกัดเปลือกต้นเลือดแรด

### 3.3 การแยกสาร การพิสูจน์โครงสร้างและการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากผลต้นสาร

นำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของผลต้นสาร (30 กรัม) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น column chromatography (CC) และ preparative thin layer chromatography (PLC) พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 8 สาร คือสาร **A-H** วิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น 1D ( $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR) และ 2D NMR (HMQC, HMBC และ COSY) พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้งหมด 8 สาร เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และเคยมีการรายงานโครงสร้างแล้ว คือ 3,2'-dihydroxy-4-methoxy-4'-prenyloxy chalcone (**A**), pongamol (**B**), karanjin (**C**), furano[2'',3'':7,8]flavone (**D**), 3,7-dimethoxyflavone (**E**), 3,3'-dimethoxyfurano[2'',3'':7,8]flavone (**F**), pongapinnol C (**G**) และ 3,6-dimethoxyfurano[2'',3'':7,8]flavone (**H**) (รูปที่ 7) จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดส่งไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารบริสุทธิ์ **A**, **D** และ **E** มีปริมาณน้อยจึงทดสอบเพียงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 และ Vero cells พบว่าสาร **A** แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 ด้วยค่า  $\text{IC}_{50} = 50.93 \mu\text{M}$  และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ส่วนอนุพันธ์ชาลโคน **B** แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, NCI-H187 และ

Vero cells ด้วยค่า  $IC_{50} = 63.64, 114.44$  และ  $28.44 \mu M$  ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารฟลาโวน **H** แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ด้วยค่า  $IC_{50} = 110.23 \mu M$



รูปที่ 7 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากผลต้นสาร

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ (**A-H**) จากผลต้นสาร

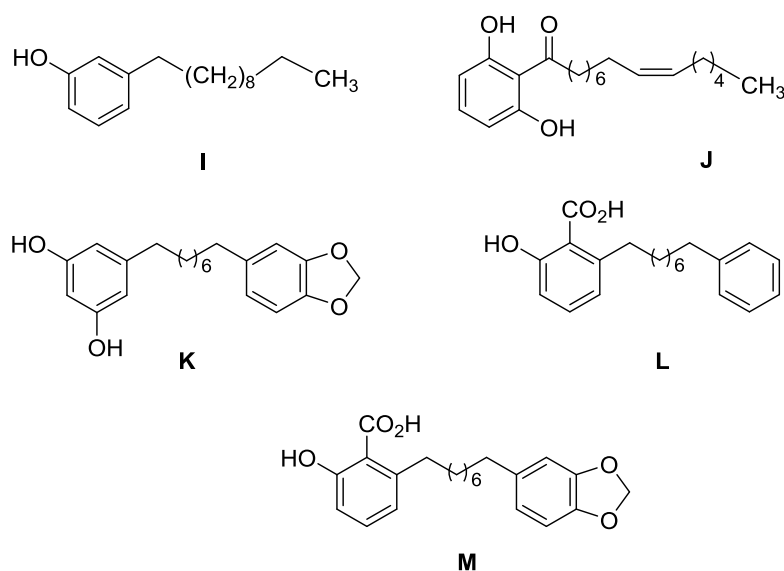
| สารบริสุทธิ์ | ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ( $IC_{50}, \mu M$ ) |                       |                       |                       |
|--------------|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|              | KB                                             | MCF-7                 | NCI-H187              | Vero cells            |
| <b>A</b>     | ND <sup>b</sup>                                | 50.93                 | ND <sup>b</sup>       | inactive <sup>a</sup> |
| <b>B</b>     | 63.64                                          | inactive <sup>a</sup> | 114.44                | 28.44                 |
| <b>C</b>     | inactive <sup>a</sup>                          | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> |
| <b>D</b>     | ND <sup>b</sup>                                | inactive <sup>a</sup> | ND <sup>b</sup>       | inactive <sup>a</sup> |
| <b>E</b>     | ND <sup>b</sup>                                | inactive <sup>a</sup> | ND <sup>b</sup>       | inactive <sup>a</sup> |
| <b>F</b>     | inactive <sup>a</sup>                          | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> |
| <b>G</b>     | inactive <sup>a</sup>                          | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> | 6.00                  |
| <b>H</b>     | 110.23                                         | inactive              | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> |
| Ellipticine  |                                                | 8.97                  | 9.54                  | 4.22                  |
| Doxorubicin  | 1.07                                           | 17.24                 | 0.40                  |                       |
| Tamoxifen    |                                                | 19.41                 |                       |                       |

<sup>a</sup> inactive at  $> 200 \mu M$ ; <sup>b</sup> ND = No Data

ผลงานวิจัยเรื่องสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และความเป็นพิษต่อเซลล์จากผลต้นสาธร (*M. leucantha* Kurz) ได้ส่งไปตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (ภาคผนวก) ซึ่งขณะนี้ได้รับการตอบรับแล้ว

### 3.4 การแยกสาร การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกต้นเลือดแรด

นำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของเปลือกต้นเลือดแรด (122 กรัม) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 5 สาร คือสาร **I-M** และวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น 1D และ 2D NMR พบสารใหม่ 1 สารคือสาร **K** และสารที่เคยมีการรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สารคือ 3-undecylphenol (**I**), 1-(2,6-dihydroxyphenyl)pentadec-9-en-1-one (**J**), kneglobularic acid A (**L**), และ kneglobularic acid B (**M**) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกต้นเลือดแรด

## 4. สรุปผลการทดลอง

จากการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีจากผลต้นสาธรและเปลือกต้นเลือดแรด พบว่าได้สารทั้งหมด 13 สาร โดยแยกสารบริสุทธิ์จากผลต้นสาธรได้ทั้งหมด 8 สาร (**A-H**) ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานโครงสร้างแล้ว จากนั้นนำสารทั้งหมดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) นอกจากนั้นการแยกสารจากเปลือกต้นเลือดแรดพบว่าได้ทั้งหมด 5 สาร (**I-M**) เป็นสารใหม่ 1 สาร และสารที่เคยรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สาร

## 5. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากสารอนุพันธ์ชาโลโคน 3,2'-dihydroxy-4-methoxy-4'-prenyloxy chalcone (**A**) ที่แยกได้จากผลต้น สารแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ จึงมีความ น่าสนใจที่นักวิจัยอาจจะนำไปศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

## 6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Smitinard T. (2001). Thai Plant Names (revised edition): The Forest Herbarium, Royal Forest Department-vernacular names. Prachachon, Bangkok, 359—360.
- [2] Geesink R. (1981) *Tephrosiae*; The Royal Botanic Gardens: Kew.
- [3] Banzouzi JT, Prost A, Rajemiaraho M, Ongoka P. (2008) Traditional uses of the African *Millettia* species (Fabaceae). *International Journal of Botany*, 4, 406—420.
- [4] Baruah P, Barua NC, Sharma RP, Baruah JN, Kulanthaivel P, Herz W. (1984) Flavonoids from *Millettia pulchra*. *Phytochemistry*, 23, 443—447.
- [5] Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Conrad J, Vogler B, Reeb S, Klaiber I, Kraus W. (2002) New flavones from *Millettia erythrocalyx*. *Journal of Natural Products*, 65, 589—591.
- [6] Yankep E, Njamen D, Fotsing MT, Fomum ZT, Mbanya JC, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Ríos JL. (2003) Griffonianone D, an isoflavone with anti-inflammatory activity from the root bark of *Millettia griffoniana*. *Journal of Natural Products*, 66, 1288—1290.
- [7] Phrutivorapongkul A, Lipipun V, Ruangrunsi N, Kirtikara K, Nishikawa K, Maruyama S, Watanabe T, Ishikawa T. (2003) Studies on the chemical constituents of stem bark of *Millettia leucantha*: isolation of new chalcones with cytotoxic, anti-herpes simplex virus and anti-inflammatory activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51, 187—190.
- [8] Rayanil K, Bunchornmaspan P, Tuntiwachwuttikul P. (2011) A new phenolic compound with anticancer activity from the wood of *Millettia leucantha*. *Archives of Pharmacal Research*, 34, 881—886.
- [9] Chatsumpun M, Sritularak B, Likhitwitayawuid K. (2010) Phenolic compounds from stem wood of *Millettia leucantha*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 643—635.
- [10] Smitinard T. (2014). Thai Plant Names (revised edition): The Forest Herbarium, Royal Forest Department-vernacular names. Prachachon, Bangkok, 306—307.

- [11] Wiart C. (2006) Medicinal Plants of Asia and the Pacific. first edition. CRC Press: Boca Raton.
- [12] Sriphana U, Yenjai C, Koatthada Mayrin. (2016) Cytotoxicity of chemical constituents from the roots of *Knema globularia*. *Phytochemistry Letters*, 16, 129–133.
- [13] Derese S, Barasa L, Akala HM, Yusuf AO, Kamau E, Heydenreich M, Yenesew A. (2014) 4'-Prenyloxyderrone from the stem bark of *Millettia oblata* ssp. *teitensis* and the antiplasmodial activities of isoflavones from some *Millettia* species. *Phytochemistry Letters*, 8, 69–72.
- [14] Takahashi M, Fuchino H, Sekita S, Satake Motoyoshi, Kiuchi F. (2006) *In vitro* leishmanicidal constituents of *Millettia pendula*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 54, 915–917.
- [15] Phrutivorapongkul A, Lipipun V, Ruangrunsi N, Kirtikara K, Nishikawa K, Maruyama S, Watanabe T, Ishikawa T. (2003) Studies on the chemical constituents of stem bark of *Millettia leucantha*: isolation of new chalcones with cytotoxic, anti-herpes simplex virus and anti-inflammatory activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51, 187–190.
- [16] Mei W, Yang Y, Ni W, Chen C. (2000) Flavonoids from *Knema globularia*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. 22, 358–360.
- [17] Mei W, Ni W, Hua Y, Chen C. (2002) Flavonoids from *Knema globularia*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 14, 26-28.

## 7. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

### 7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 7.1.1 งานวิจัยจากผลต้นสารรร ได้ส่งไปตีพิมพ์ที่วารสาร *Natural Product Communications* ในหัวข้อเรื่อง Flavonoids from *Millettia leucantha* and Their Cytotoxicity และได้รับการตอบรับแล้ว (ภาคผนวก)
- 7.1.2 งานวิจัยจากเปลือกต้นเลือดแรดอยู่ในขั้นตอนการรวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียม manuscript

### 7.2 การผลิตบัณฑิต

ทุนวิจัยนี้ได้มีส่วนช่วยสนับสนุนการทำวิจัยของนักศึกษาสาขาวิชาเคมี ระดับปริญญาตรี จำนวน 4 คน

## ภาคผนวก

|                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p style="text-align: center;"><b>Natural Product Communications</b><br/><b>Acceptance</b></p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|

Westerville, Ohio, April 7, 2018

Dear Prof. Sriphana,

I am pleased to inform you that your revised manuscript entitled "Flavonoids from *Milletia leucantha* and Their Cytotoxicity" MS# P757612, has been accepted for publication in *Natural Product Communications*.

You will receive galleys and a Copyright Transfer form directly from publisher within two months.

Yours sincerely,

Dr. Pawan K. Agrawal  
Editor-in-Chief  
Natural Product Communications  
E-mail: [agrawal@naturalproduct.us](mailto:agrawal@naturalproduct.us)

Flavonoids from *Milletia leucantha* and Their CytotoxicityUraiwan Sriphana<sup>a,\*</sup>, Chavi Yenjai<sup>b</sup>, Siriporn Tungnoi<sup>a</sup>, Jongjai Srirapa<sup>a</sup> and Auemporn Junsongduang<sup>a</sup><sup>a</sup>Department of Science and Technology, Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University, Roi Et 45120, Thailand<sup>b</sup>Natural Products Research Unit, Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

uraiwan\_s49@yahoo.com

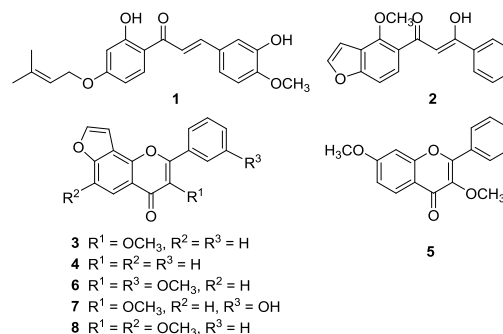
Received: February 25<sup>th</sup>, 2018; Accepted: XX, 2018

Two known chalcones (**1-2**), five known flavonol derivatives (**3** and **5-8**) and one flavone (**4**) were isolated for the first time from fruits of *Milletia leucantha* Kurz. In addition, **5** was found for the first time from this genus. Their structures were elucidated on the basis of IR, MS, 1D and 2D NMR techniques. Chalcone **1** exhibited moderate cytotoxicity against the MCF-7 cell line with an  $IC_{50}$  value of 50.93  $\mu$ M, whereas this compound showed inactive cytotoxicity against Vero cells. Compound **2** exhibited cytotoxicity against the KB, NCI-H187 and Vero cell lines with  $IC_{50}$  values of 63.64, 114.44 and 28.44  $\mu$ M, respectively. Compound **8** only showed cytotoxic activity against the KB cell line with an  $IC_{50}$  value of 110.23  $\mu$ M.

**Keywords:** *Milletia leucantha*; cytotoxicity; chalcone; flavone, flavonol.

*Milletia leucantha* Kurz (Leguminosae) known in Thai as “Sathorn”, is growing throughout Thailand [1]. The stems of this plant are used for construction and to make furniture. However its pharmaceutical activities have been unknown until now. Chemical investigations of six chalcones and five flavones have been isolated from the stem bark [2]. Pterocarpan and phenolic compounds have been investigated from stem wood [3,4]. Some isolates show anti-viral, anti-plasmodial, anti-cancer and anti-inflammatory activity [2,3,5], whereas the chemical constituents from the fruits have not yet been reported. Herein, the isolation and the structural characterization of eight compounds from the fruits of this plant are reported. Cytotoxicity was tested against KB, MCF-7, NCI-H187 and Vero cells.

The EtOAc extract from the fruits of *M. leucantha* Kurz, and further chemical investigations of all isolates by spectroscopic method, including MS, IR, 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and DEPT) and 2D NMR (COSY, HMQC and HMBC) and by comparison with literature values led to two known chalcones, 3,2'-dihydroxy-4-methoxy-4'-prenyloxy chalcone (**1**) [6] and pongamol (**2**) [7], together with six known compounds, karanjin (**3**) [8], furano[2'',3'':7,8]flavone (**4**) [9], 3,7-dimethoxyflavone (**5**) [10], 3,3'-dimethoxyfurano[2'',3'':7,8]flavone (**6**) [11], pongapinnol C (**7**) [10] and 3,6-dimethoxyfurano [2'',3'':7,8]flavone (**8**) [12] (Figure 1.). Compound **5** was isolated for the first time from this genus.

**Figure 1.** Structure of isolated compounds (**1-8**).

Almost all isolated compounds were evaluated for their cytotoxic abilities against three human cancer cell lines, including KB (oral human epidermal carcinoma), NCI-H187 (human small cell lung cancer), MCF-7 (breast cancer) and the Vero cell line (African green monkey kidney). Due to the small amount of **1**, **4** and **5**, cytotoxic evaluation against only MCF-7 and Vero cell lines were performed (Table 1.). Compound **8** showed weak cytotoxicity against KB cells ( $IC_{50} = 110.23 \mu$ M) and showed no activity to MCF-7 and NCI-H187 cell lines. In addition, flavonol derivatives **3**, **6** and **7** showed inactive cytotoxic activity against the KB, MCF-7 and NCI-H187 cell lines. The results demonstrate that the C-6 methoxy group may play an important role in KB cell line. Pongamol **2** exhibited cytotoxicity against KB and NCI-H187 cell lines with  $IC_{50}$  values of 63.64 and 114.44  $\mu$ M, respectively. However, **2** displayed cytotoxicity against Vero cells ( $IC_{50} = 28.44 \mu$ M). Compound **1** exhibited

moderate cytotoxic activity against the MCF-7 cell line with an  $IC_{50}$  value of  $50.93 \mu M$ . Interestingly, this compound selected to MCF-7 cells.

**Table 1:** Cytotoxicity of isolated compounds (1–8).

| Comps       | Cytotoxicity ( $IC_{50}$ , $\mu M$ ) |                       |                       |                       |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|             | KB                                   | MCF-7                 | NCI-H187              | Vero cells            |
| <b>1</b>    | ND <sup>b</sup>                      | 50.93                 | ND <sup>b</sup>       | inactive <sup>a</sup> |
| <b>2</b>    | 63.64                                | inactive <sup>a</sup> | 114.44                | 28.44                 |
| <b>3</b>    | inactive <sup>a</sup>                | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> |
| <b>4</b>    | ND <sup>b</sup>                      | inactive <sup>a</sup> | ND <sup>b</sup>       | inactive <sup>a</sup> |
| <b>5</b>    | ND <sup>b</sup>                      | inactive <sup>a</sup> | ND <sup>b</sup>       | inactive <sup>a</sup> |
| <b>6</b>    | inactive <sup>a</sup>                | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> |
| <b>7</b>    | inactive <sup>a</sup>                | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> | 6.00                  |
| <b>8</b>    | 110.23                               | inactive              | inactive <sup>a</sup> | inactive <sup>a</sup> |
| Ellipticine |                                      | 8.97                  | 9.54                  | 4.22                  |
| Doxorubicin | 1.07                                 | 17.24                 | 0.40                  |                       |
| Tamoxifen   |                                      | 19.41                 |                       |                       |

<sup>a</sup> inactive at  $> 200 \mu M$ ; <sup>b</sup>ND = No Data

In conclusion, eight known compounds (**1–8**) were isolated from fruits of *M. leucantha* Kurz. Chalcone **1** exhibited moderate and inactive cytotoxicity against the MCF-7 ( $IC_{50} = 50.93 \mu M$ ) and Vero cell lines, respectively. Pongamol (**2**) showed weak cytotoxicity against the KB and NCI-H187 and Vero cells with  $IC_{50}$  values ranging from 28.44 to  $114.44 \mu M$ . Compound **8** exhibited moderate cytotoxicity against the KB cell line ( $IC_{50} = 110.23 \mu M$ ). This is the first report of the presence of **5** in the *Millettia* genus.

## Experimental

**Plant material:** The fruits of *M. leucantha* Kurz (Leguminosae) were collected in April 2015 from Roi Et Province. The plant was identified by Dr. Auemporn Junsongduang, Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University. A botanically identified voucher specimen (USRERU001) was deposited at the herbarium of the Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University, Thailand.

**Extraction and isolation:** Air-dried and finely powdered fruits of *M. leucantha* Kurz (5.0 kg) were sequentially extracted at room temperature for three days with hexane (2 x 3 L), EtOAc (2 x 3 L) and MeOH (2 x 3 L). The extracts were evaporated *in vacuo* to obtain crude hexane (32 g), crude EtOAc (30 g) and crude MeOH (45 g). The EtOAc extract (30 g) was subjected to silica gel flash column chromatography (FCC), eluted with a gradient of three solvents (hexane, EtOAc and MeOH) by gradually

increasing the polarity of the elution solvents system. The eluents were collected and monitored by TLC resulting in nine groups (F1–F9). F1 (5.12 g) was subjected to FCC and eluted with  $CH_2Cl_2$ :hexane mixtures to yield **2** (24 mg). F3 (1.02 g) was separated by FCC and eluted with  $CH_2Cl_2$ :hexane mixtures of increasing polarity, yielding eight subfractions (F3.1–F3.8). F3.1 (65 mg) was purified by preparative thin layer chromatography (PLC) ( $CH_2Cl_2$ :hexane, 20:80) to give **3** (32 mg). F5 (2.45 g) was purified by FCC and eluted with  $CH_2Cl_2$ :hexane mixtures to afford F5.1–F5.12. F5.3 (10 mg) was purified by PLC ( $CH_2Cl_2$ :hexane, 30:70) furnished **4** (4 mg). Separation of F5.5 (13 mg) was purified by PLC ( $CH_2Cl_2$ :hexane, 35:65) to give **5** (5 mg). F5.10 (53 mg) was purified by PLC (EtOAc: $CH_2Cl_2$ , 20:80) to afford **6** (22 mg). F7 (1.45 g) was performed using silica gel CC and eluted with an isocratic system ( $CH_2Cl_2$ , 100) to afford **1** (6 mg). F8 (920 mg) was subjected to FCC and elution with EtOAc:hexane mixtures produced **7** (18 mg). F9 (87 mg) was purified by PLC (MeOH: $CH_2Cl_2$ , 1:99) to yield **8** (26 mg).

**Cytotoxicity assays:** Cytotoxicity assays against oral human epidermoid carcinoma (KB), breast adenocarcinoma (MCF-7) and human small cell lung cancer (NCI-H187) cell lines were performed employing resazurin microplate assay (REMA) [13], while cytotoxicity assay against Vero cells (African green monkey kidney) [14] was performed by green fluorescent protein (GFP)-based assay. Ellipticine, Tamoxifen, and Doxorubicin were included as the reference substances.

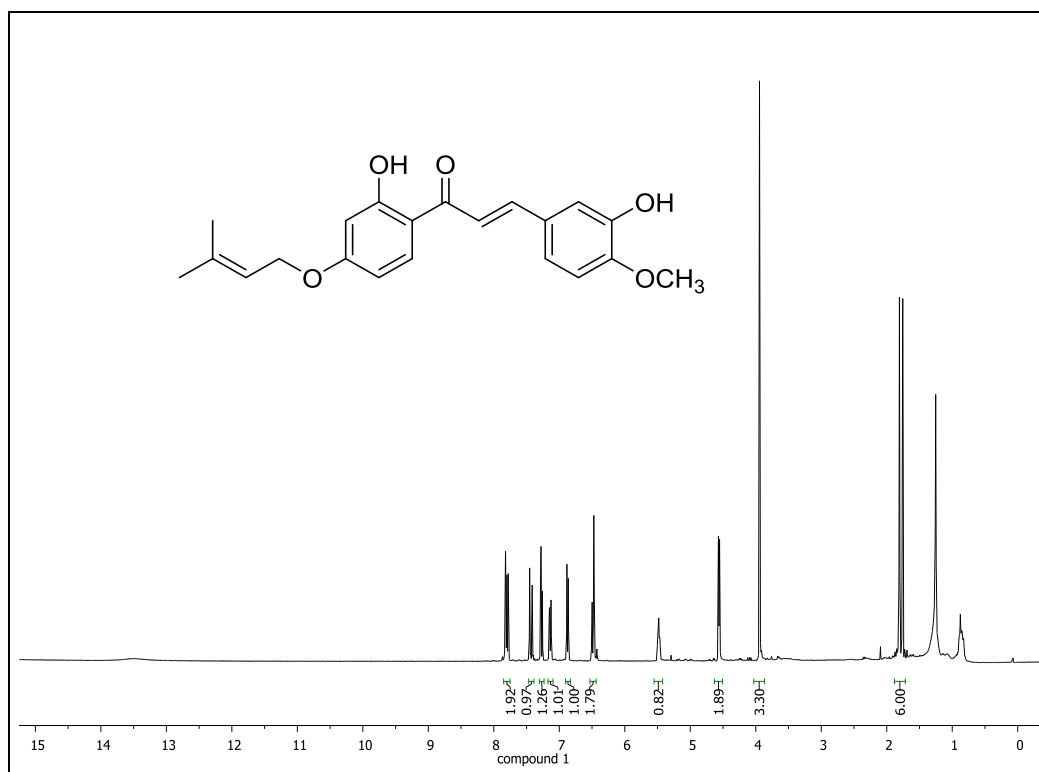
**Supplementary data:** The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra of all compounds (**1–8**).

**Acknowledgements** - We thank the Thailand Research Fund [grant number MRG5980241] for financial support. We also thank the Roi Et Rajabhat University and the Natural Product Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand for kindly providing the research facilities. The Bioassay Laboratory of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, Thailand is gratefully acknowledged for biological activity assays.

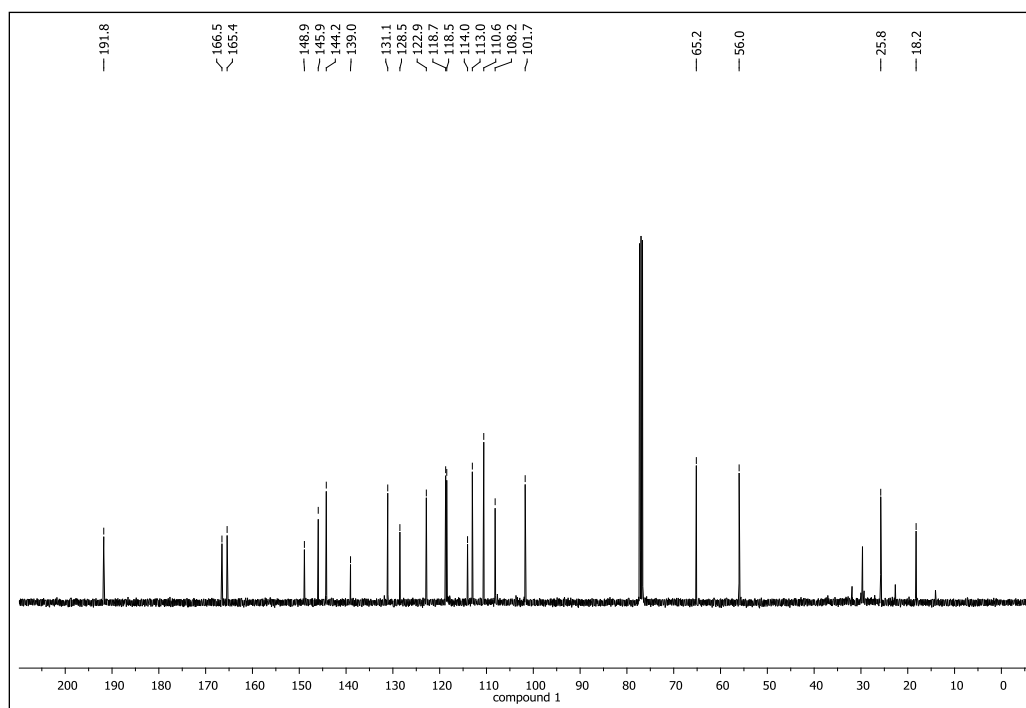
## References

- [1] Smitinard T. (2001). Thai Plant Names (revised edition): The Forest Herbarium, Royal Forest Department-vernacular names. Prachachon, Bangkok, 359–360.
- [2] Phrutivorapongkul A, Lipipun V, Ruangrunsi N, Kirtikara K, Nishikawa K, Maruyama S, Watanabe T, Ishikawa T. (2003) Studies on the chemical constituents of stem bark of *Millettia leucantha*: isolation of new chalcones with cytotoxic, anti-herpes simplex virus and anti-inflammatory activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**, 187–190.
- [3] Rayanil K, Bunchommaspan P, Tuntiwachwuttikul P. (2011) A new phenolic compound with anticancer activity from the wood of *Millettia leucantha*. *Archives of Pharmacol Research*, **34**, 881–886.
- [4] Chatsumpun M, Sritularak B, Likhitwitayawuid K. (2010) Phenolic compounds from stem wood of *Millettia leucantha*. *Chemistry of Natural Compounds*, **46**, 643–635.
- [5] Derese S, Barasa L, Akala HM, Yusuf AO, Kamau E, Heydenreich M, Yenesew A. (2014) 4'-Prenyloxyderrone from the stem bark of *Millettia oblata* ssp. *teitensis* and the antiplasmodial activities of isoflavones from some *Millettia* species. *Phytochemistry Letters*, **8**, 69–72.
- [6] Sritularak B, Likhitwitayawuid K. (2006) Flavonoids from the pods of *Millettia erythrocalyx*. *Phytochemistry*, **67**, 812–817.
- [7] Virinder SP, Jatendera SR, Jain R, Henderson DA, Malone JF. (1989) Occurrence of pongamol as the enol structure in *Tephrosia purpurea*. *Phytochemistry*, **28**, 591–593.

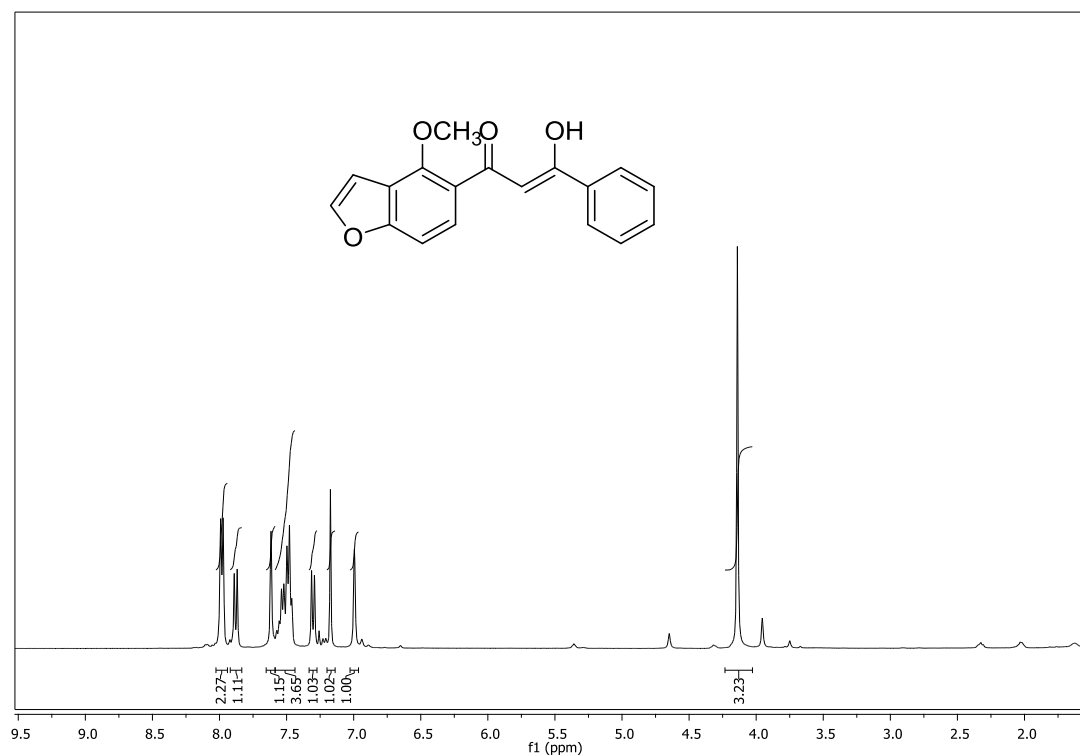
- [8] Magalhaes AF, Tozzi AMA, Magalhaes EG, Nogueira MA, Queiroz SCN. (2000) Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. *Phytochemistry*, **55**, 787–792.
- [9] Narayanaswamy S, Rangaswami S, Seshadri TR. (1954) Pongamol II. *Journal of the Chemical Society*, 1871–1873.
- [10] Prem P, Yadav G. A, Rakesh M. (2004) Furanoflavonoids from *Pongamia pinnata* fruits. *Phytochemistry*, **65**, 439–443.
- [11] Weiyang S, Yafei Z, Shanyue G, Shizhou Z, Fengting C. (2001) Study on chemical constituents of thickfruit *Millettia* root A00. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, **13**, 1–4.
- [12] Kamperdick C, Phuong NM, Sung TV, Adam G. (1998) Flavones and isoflavones from *Millettia ichthyochtona*. *Phytochemistry*, **48**, 577–579.
- [13] O' Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 5421–5426.
- [14] Hunt L, Jordan M, De Jesus M, Wurm FM. (1999) GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode. *Biotechnology and Bioengineering*, **65**, 201–205.



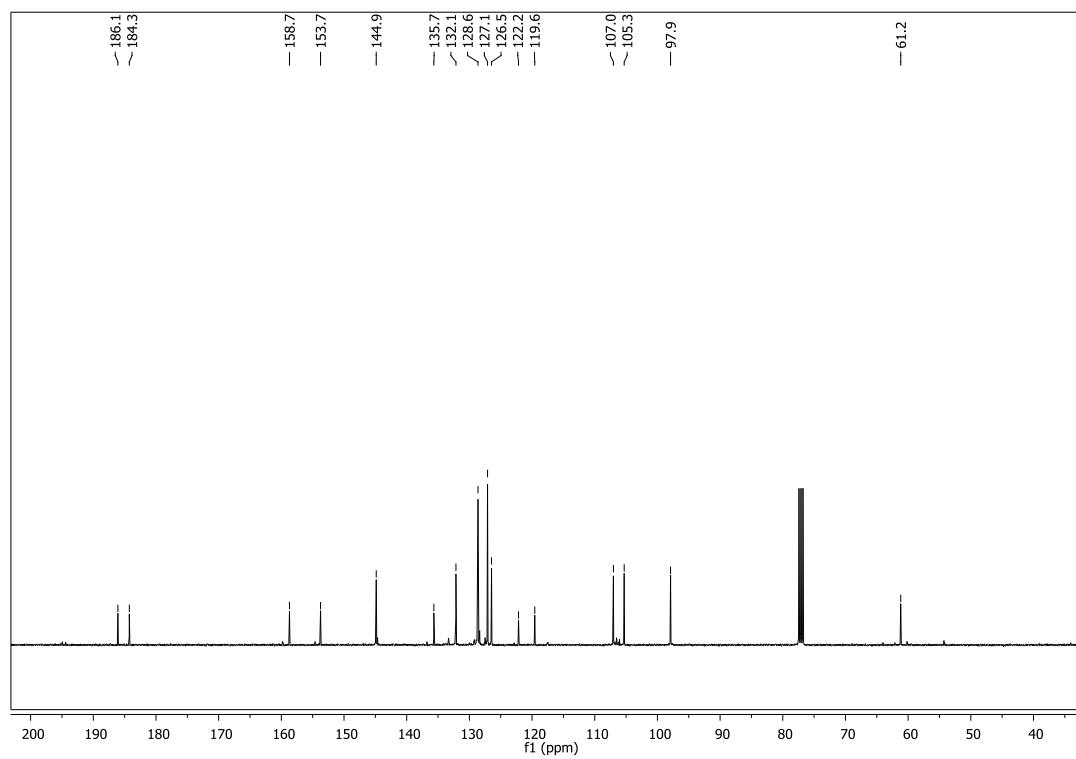
รูปที่ S1 <sup>1</sup>H NMR spectrum of **A** from *M. leucantha*



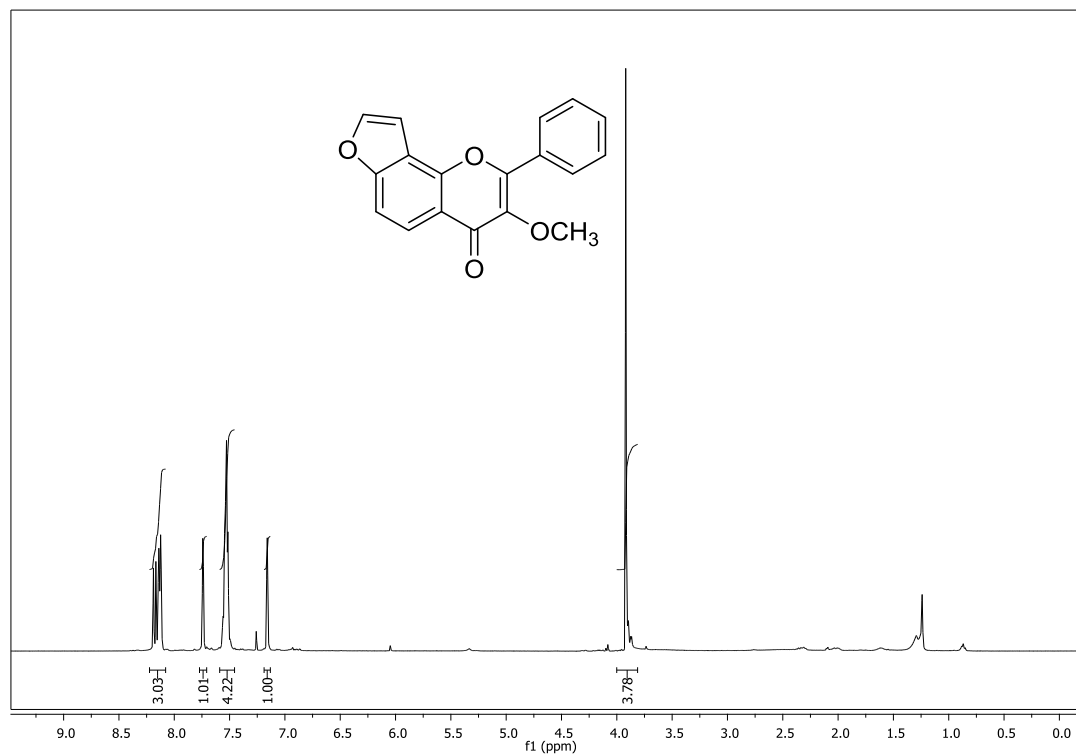
รูปที่ S2 <sup>13</sup>C NMR spectrum of **A** from *M. leucantha*



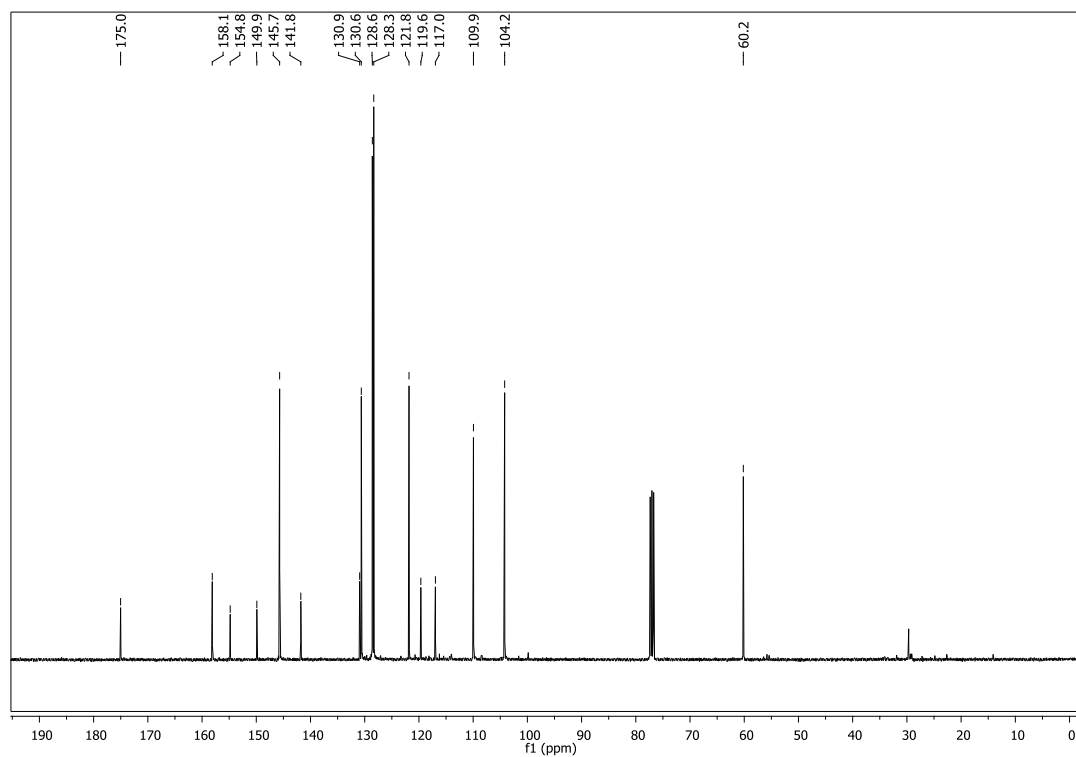
รูปที่ S3 <sup>1</sup>H NMR spectrum of **B** from *M. leucantha*



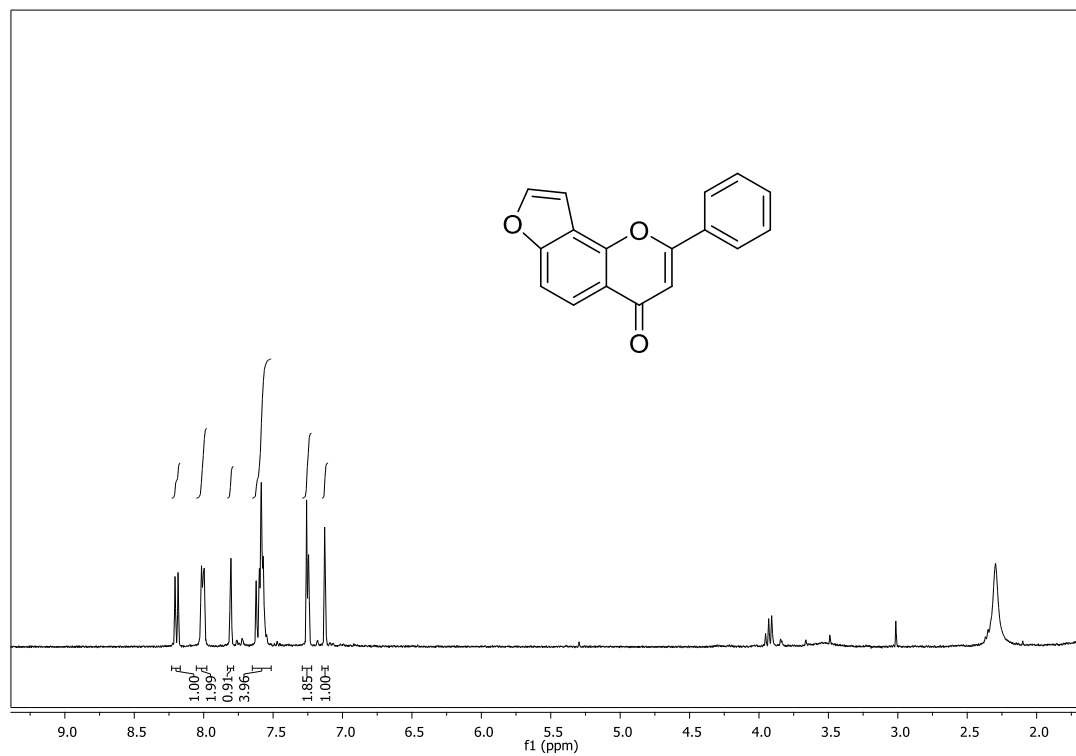
รูปที่ S4 <sup>13</sup>C NMR spectrum of **B** from *M. leucantha*



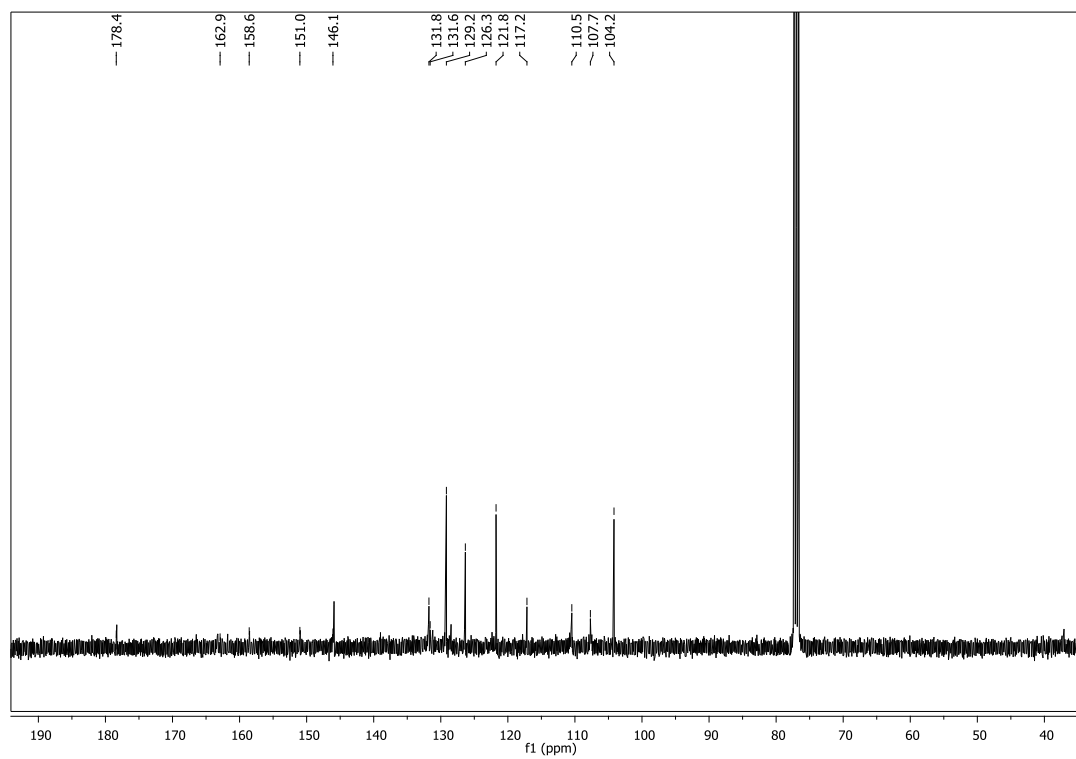
รูปที่ S5 <sup>1</sup>H NMR spectrum of **C** from *M. leucantha*



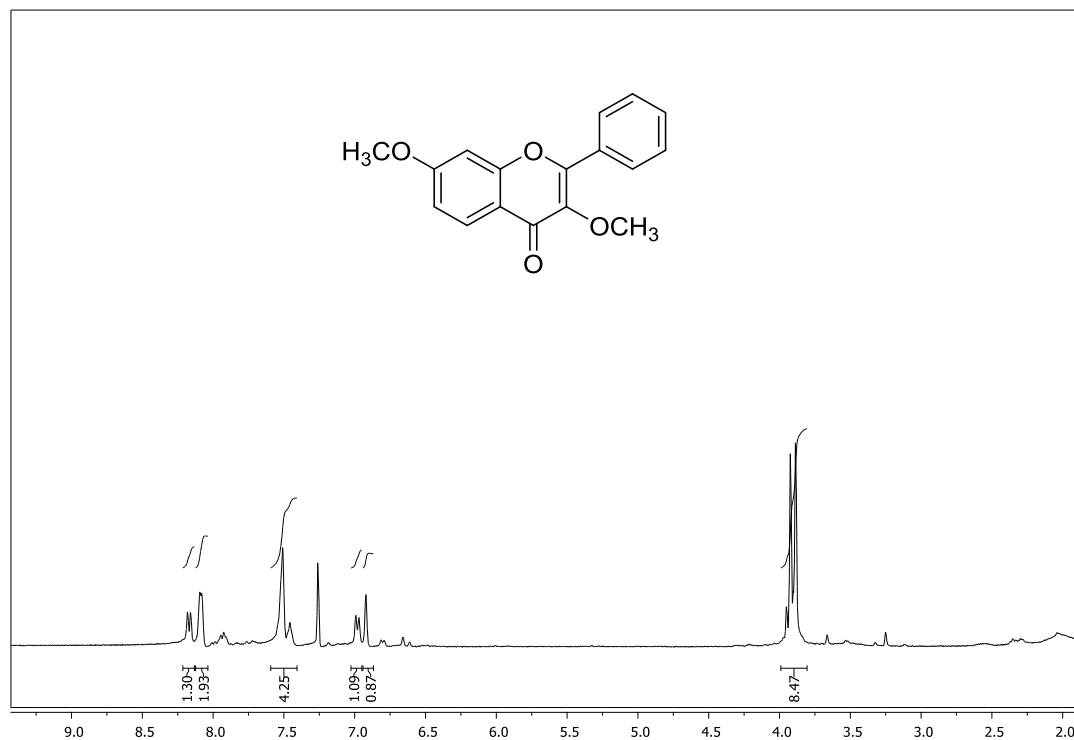
รูปที่ S6 <sup>13</sup>C NMR spectrum of **C** from *M. leucantha*



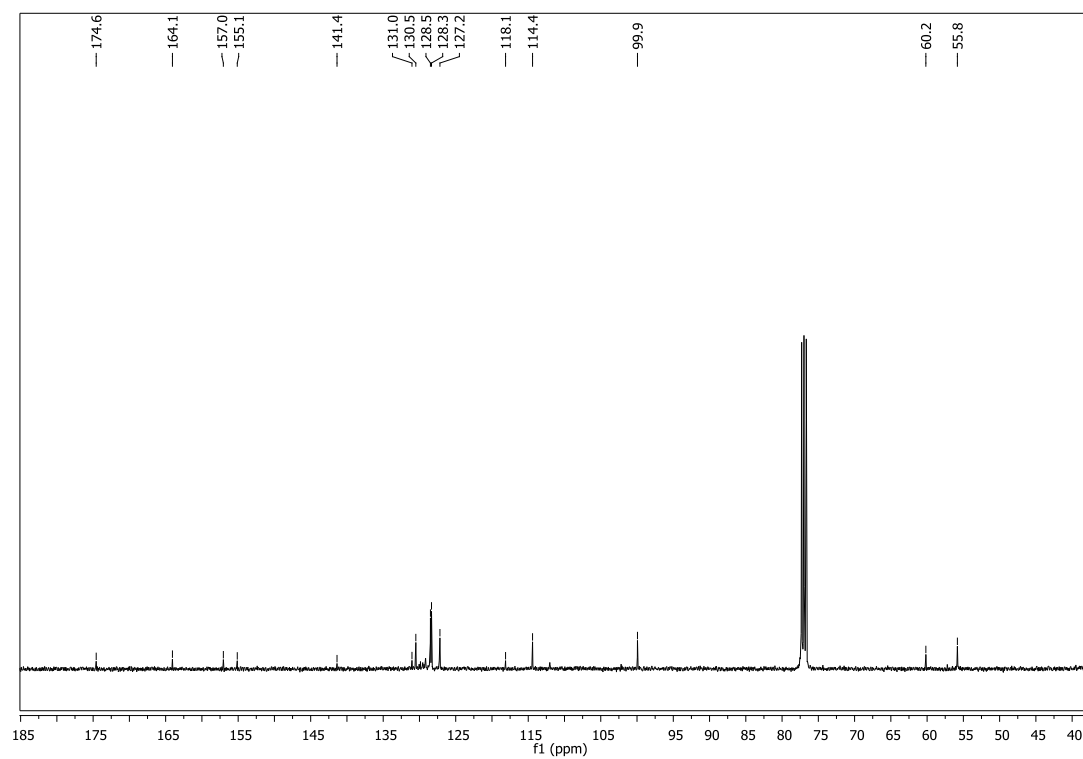
รูปที่ S7  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **D** from *M. leucantha*



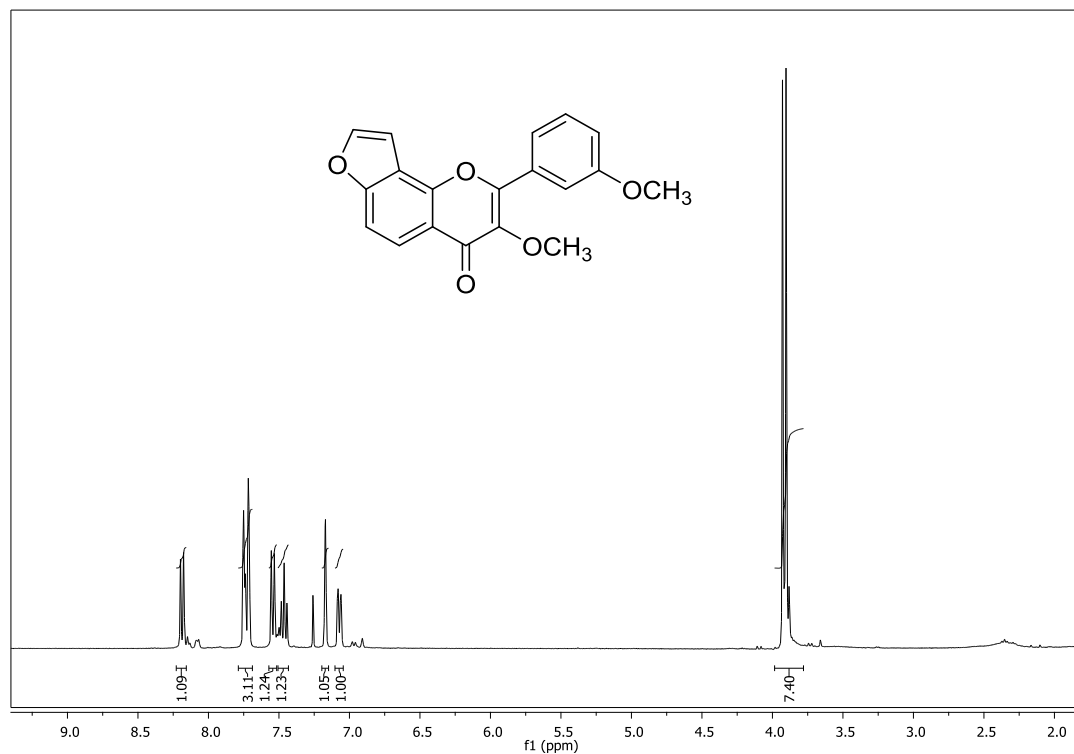
รูปที่ S8  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **D** from *M. leucantha*



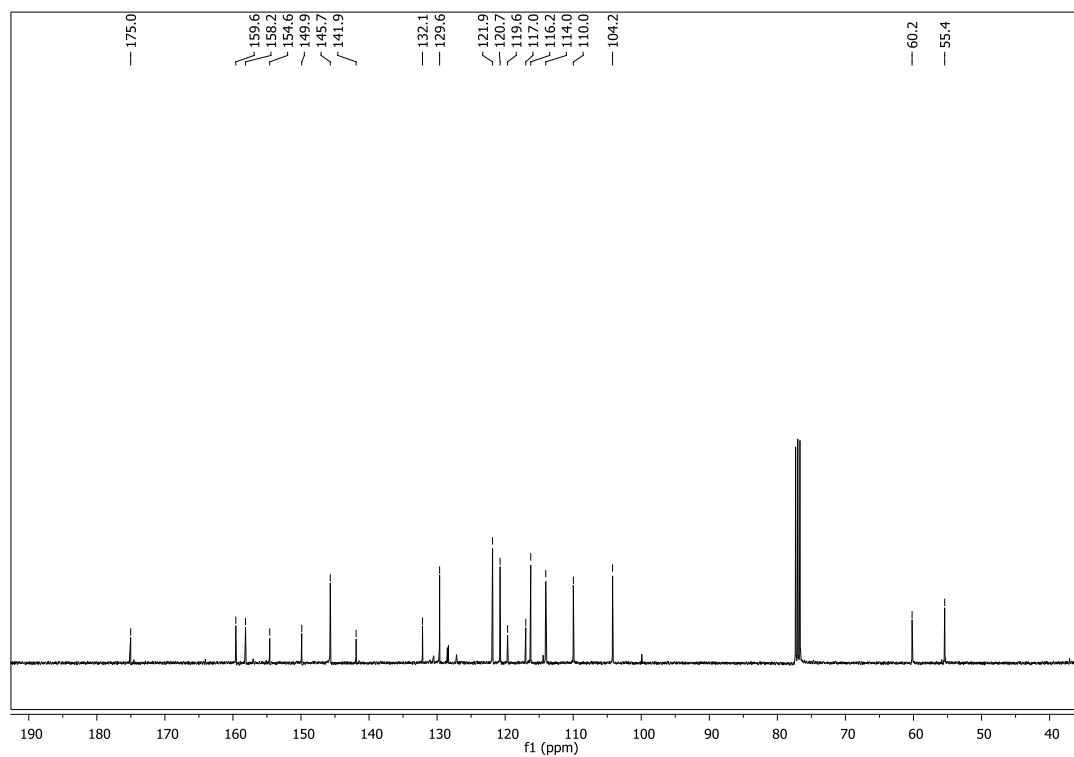
รูปที่ 9  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **E** from *M. leucantha*



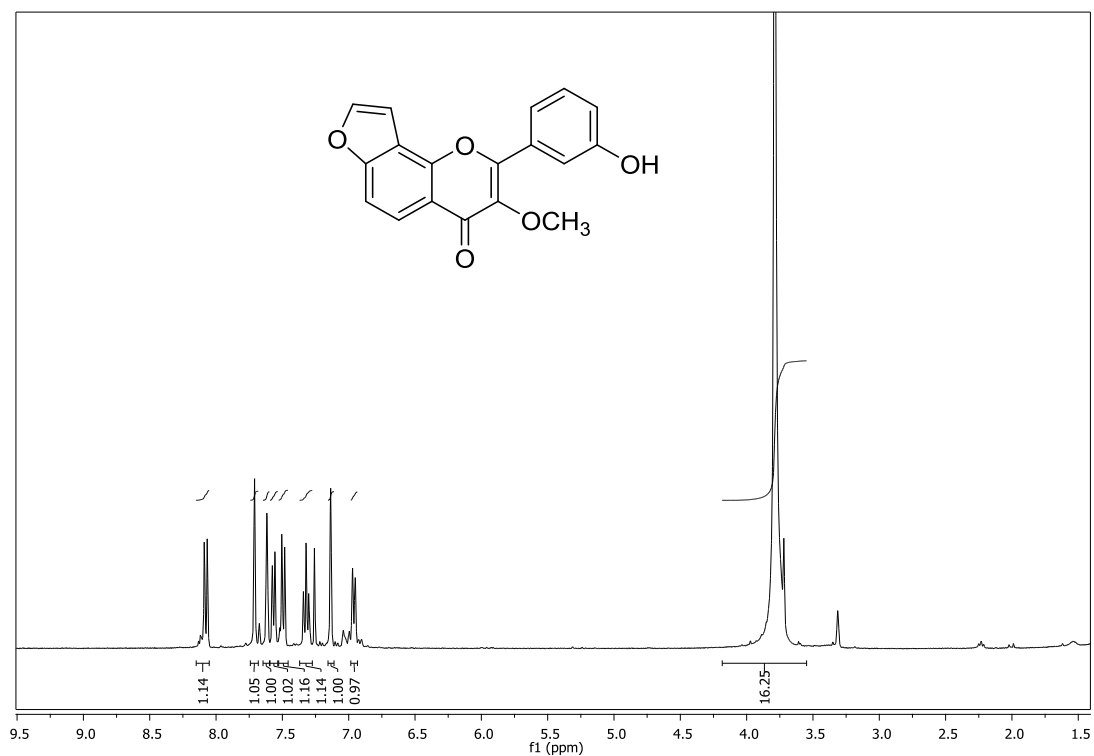
รูปที่ 10  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **E** from *M. leucantha*



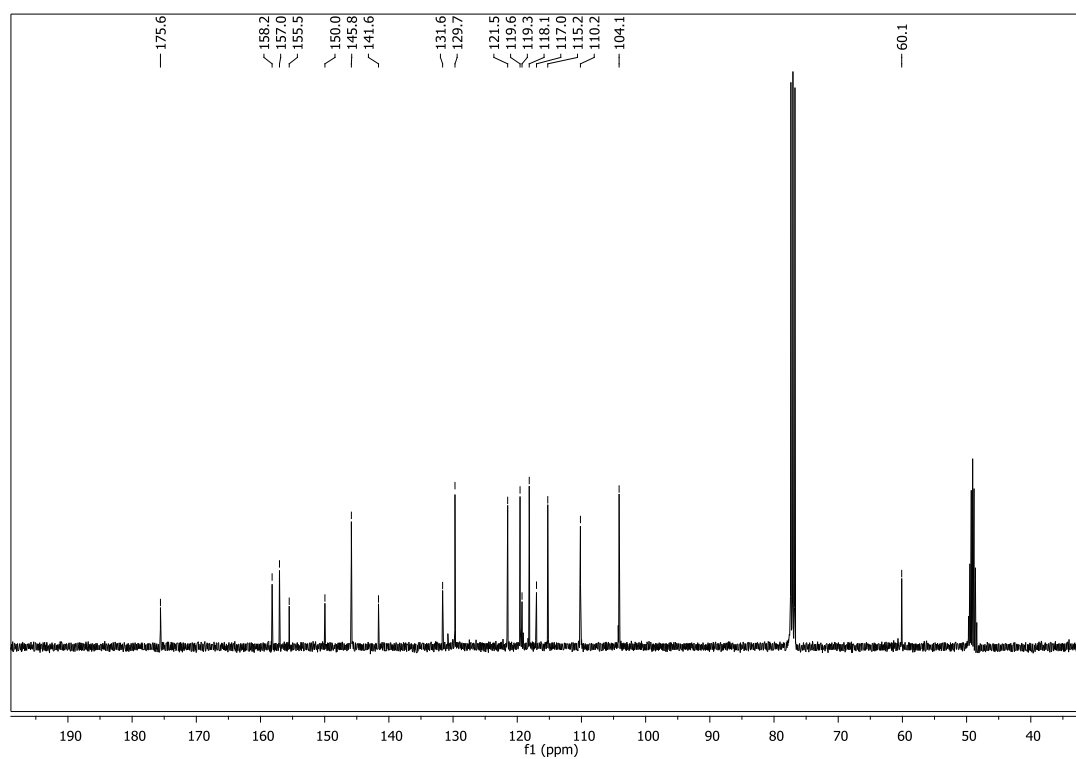
รูปที่ S11 <sup>1</sup>H NMR spectrum of F from *M. leucantha*



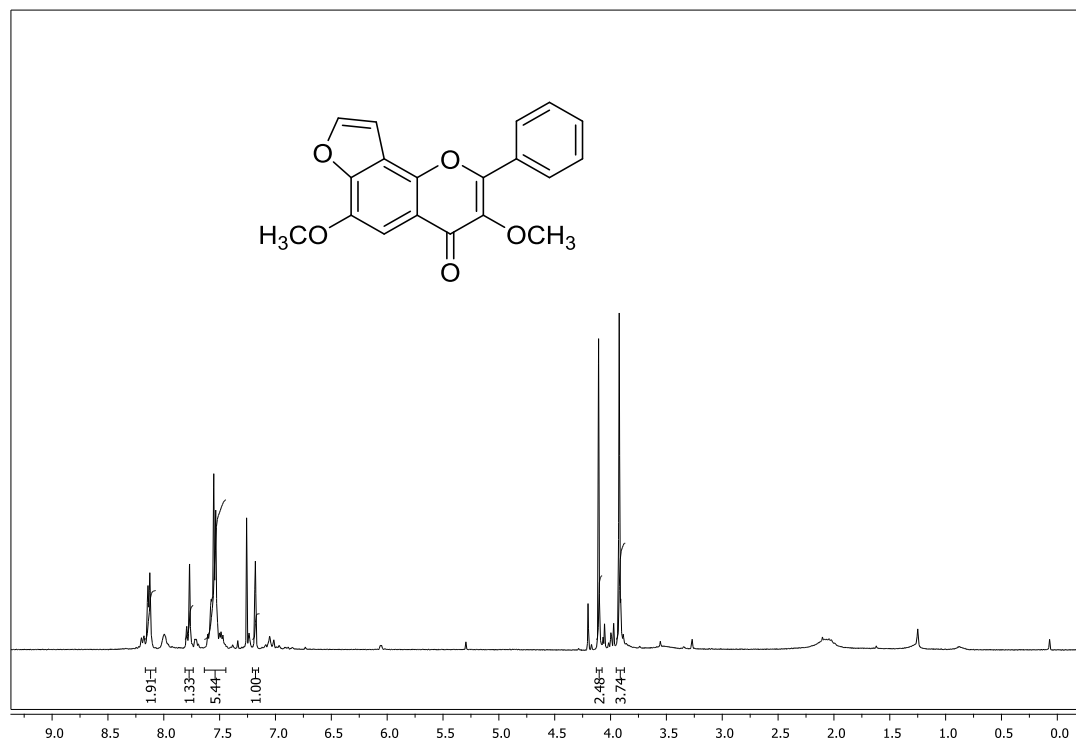
รูปที่ S12 <sup>13</sup>C NMR spectrum of F from *M. leucantha*



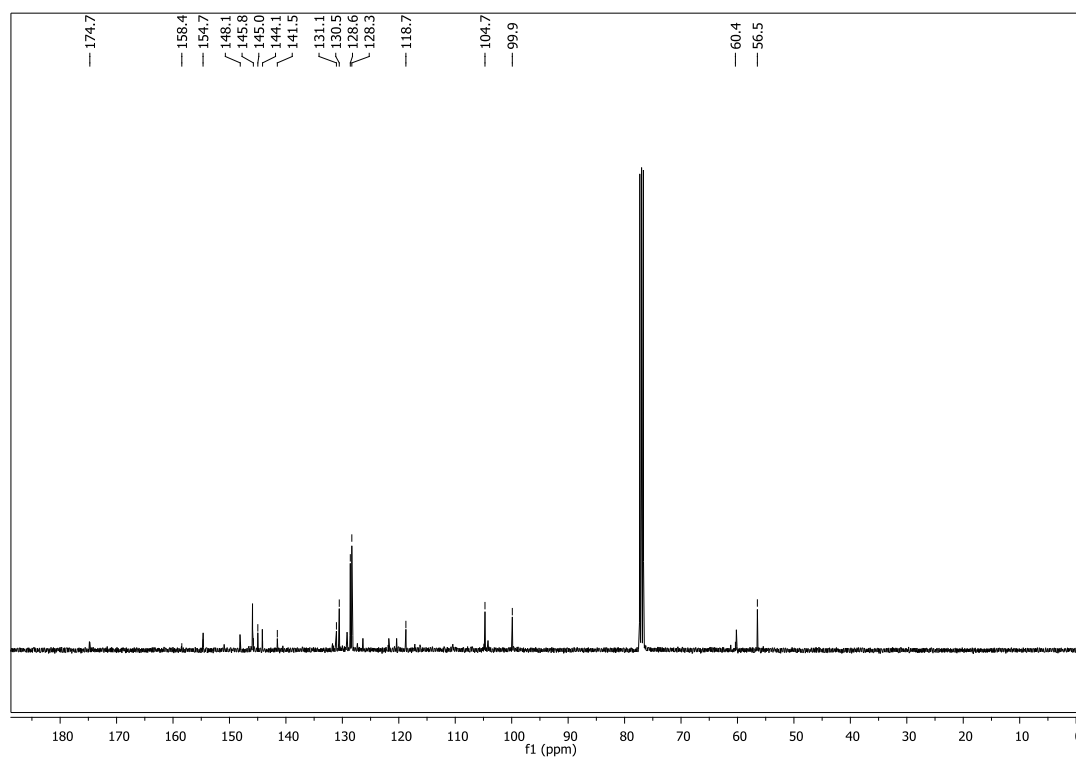
รูปที่ S13 <sup>1</sup>H NMR spectrum of **G** from *M. leucantha*



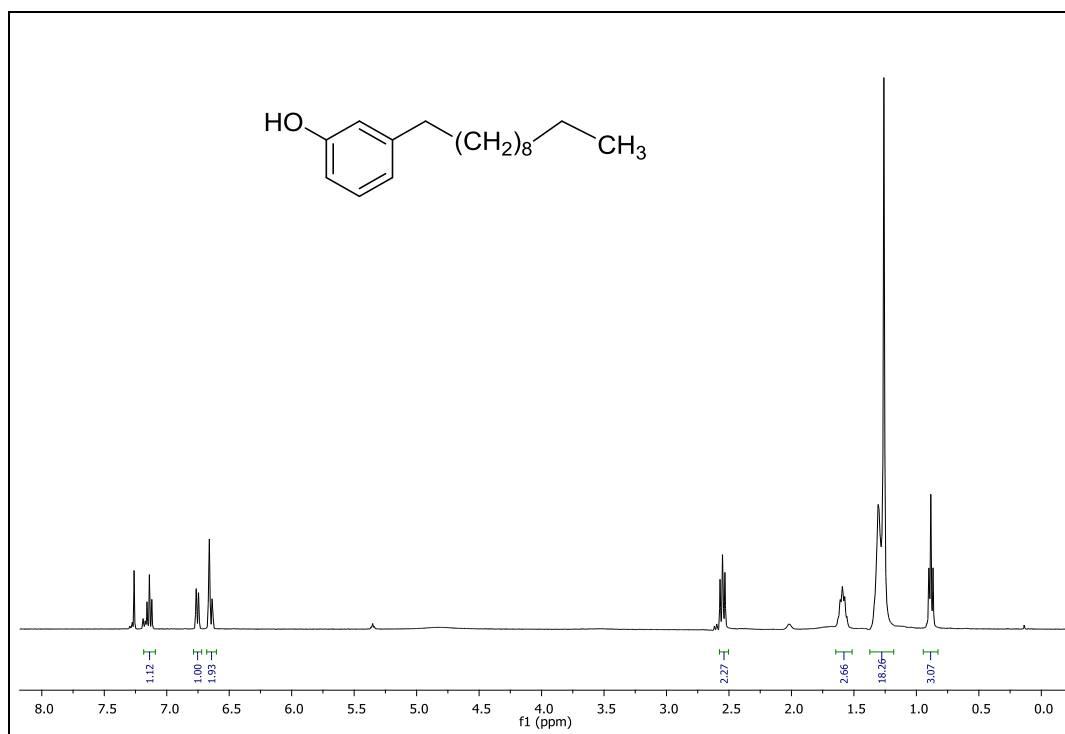
รูปที่ S14 <sup>13</sup>C NMR spectrum of **G** from *M. leucantha*



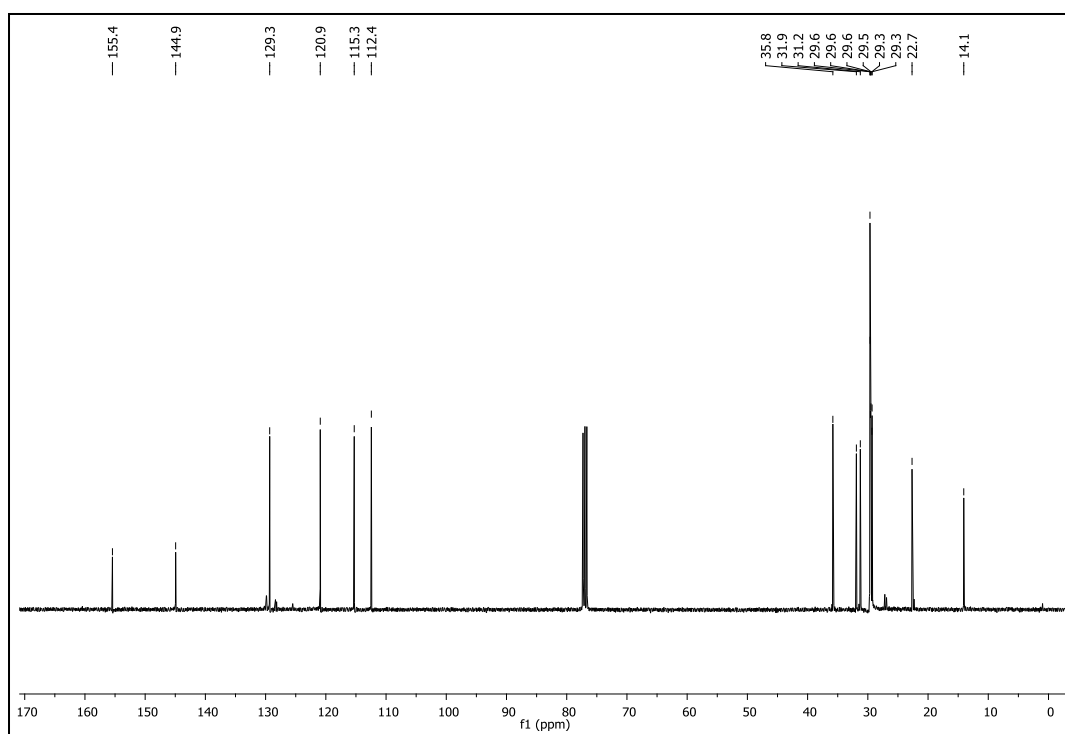
รูปที่ S15  $^1\text{H}$  NMR spectrum of H from *M. leucantha*



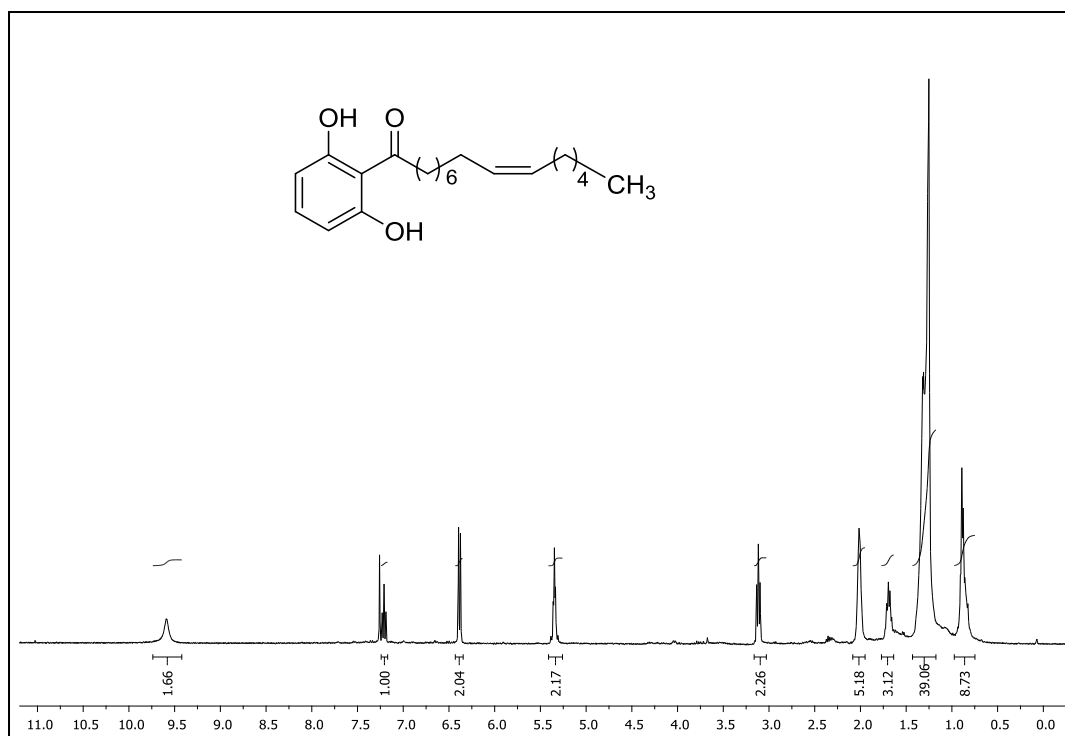
รูปที่ S16  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of H from *M. leucantha*



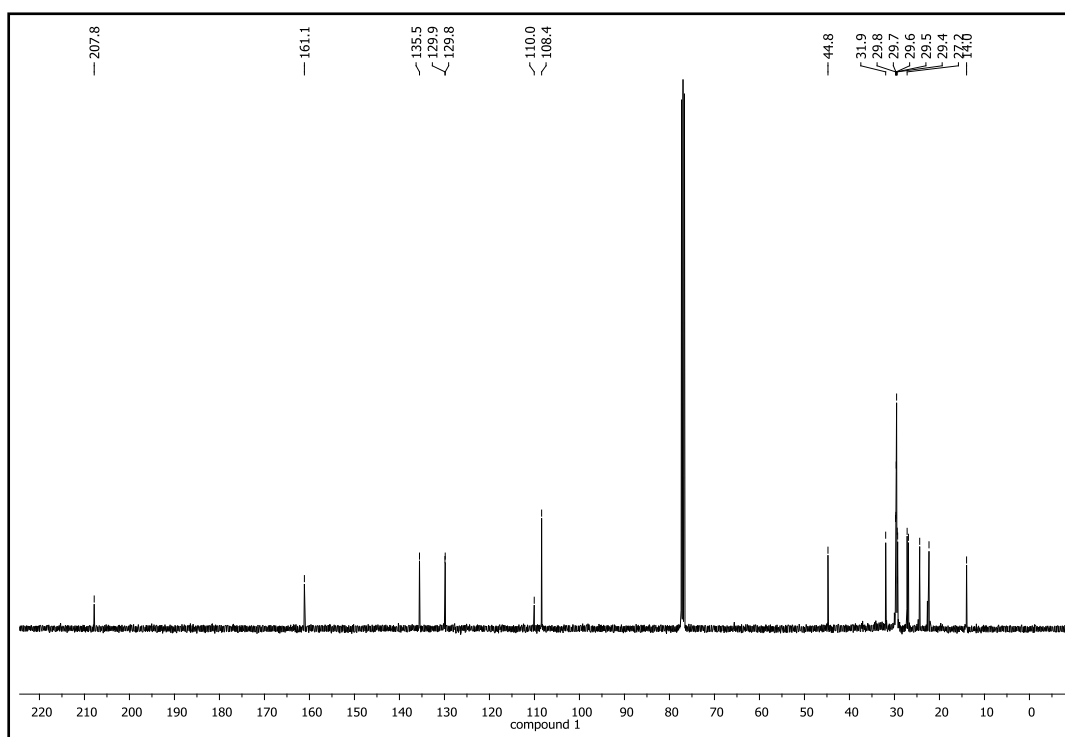
รูปที่ S17 <sup>1</sup>H NMR spectrum of I from *K. globularia*



รูปที่ S18 <sup>13</sup>C NMR spectrum of I from *K. globularia*

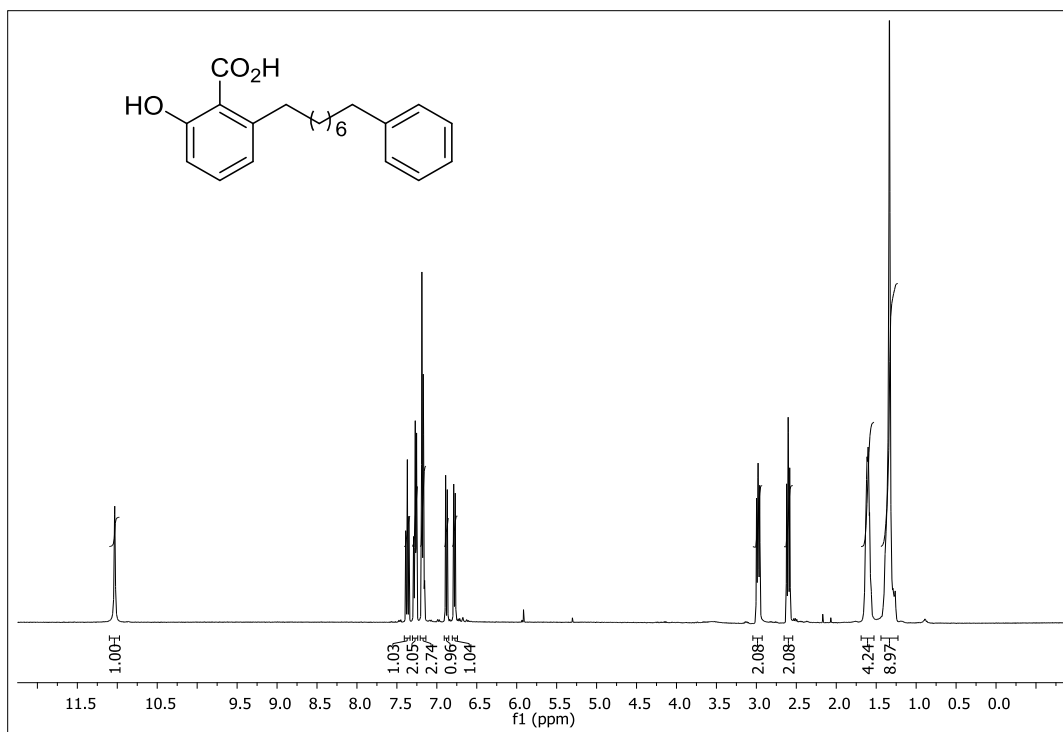


រូបភាព S19 <sup>1</sup>H NMR spectrum of J from *K. globularia*

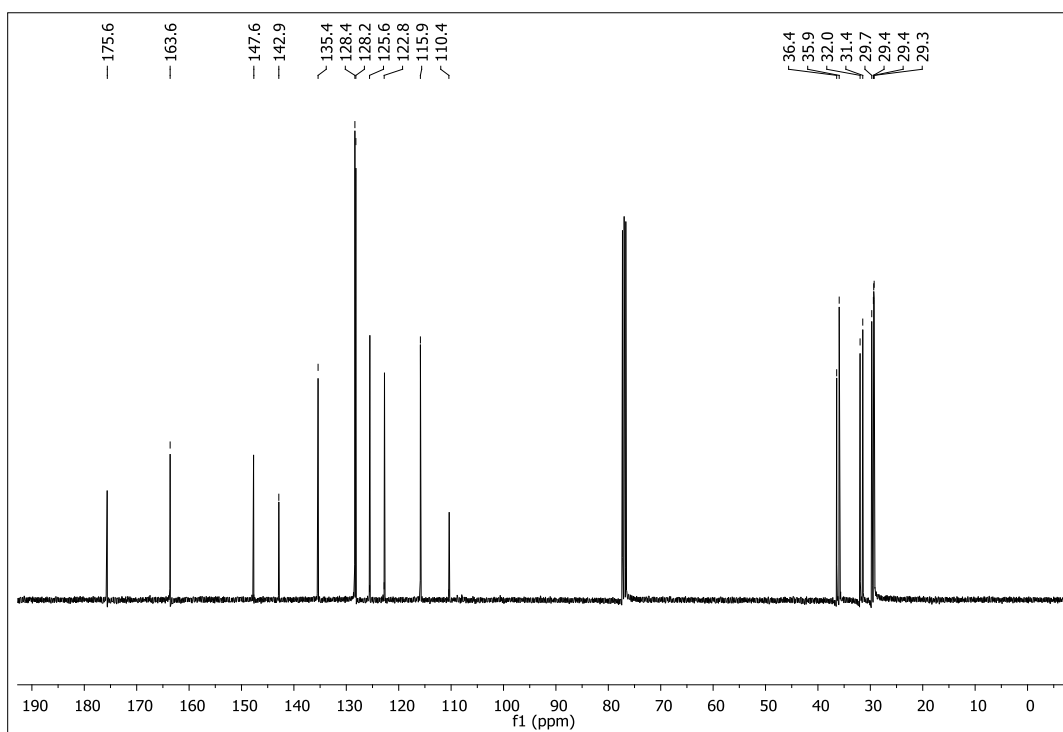


រូបភាព S20 <sup>13</sup>C NMR spectrum of J from *K. globularia*





รูปที่ S23 <sup>1</sup>H NMR spectrum of L from *K. globularia*



รูปที่ S24 <sup>13</sup>C NMR spectrum of L from *K. globularia*

13C NMR spectrum (CDCl<sub>3</sub>) of compound 10. The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 190 to 0. The spectrum shows several sharp peaks. Key peaks are labeled with their chemical shifts: 175.9, 163.5, 147.7, 147.4, 145.3, 136.8, 135.3, 122.7, 121.0, 115.8, 110.6, 108.8, 108.0, 100.6, 77.0 (triplet), 36.4, 35.6, 31.9, 31.7, 29.7, 29.4, 29.4, 29.1. The peaks are grouped with brackets and lines indicating their assignments.

รูปที่ S26  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **M** from *K. globularia*