



องค์ประกอบทางเคมีจากใบของจันทน์หอม

Chemical Constituents from *Clausena harmandiana* Leaves

อัจฉรา รักสัตย์ ชลพิสุทธิ์ ตันตาปกุล วิษณุ มณีรัตน์ และ สุรัตน์ ละภูเขียว*

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ต. ท่าสูด อ. เมือง จ. เชียงราย

*Corresponding Author, E-mail: surat.lap@mfu.ac.th

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบจันทน์หอมสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 6 สารคือ methyl carbazole-3-carboxylate (1), clausemine D (2), clausine F (3), heptaphylline (4) *p*-anethole (5) และ *p*-methoxybenzoic acid (6) การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้โดยอาศัยข้อมูล ^1H NMR สเปกโทรสโกปี และการเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารประกอบที่มีการรายงานแล้ว ส่วนสกัดหยาบใบจันทน์หอมและสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 1-4 ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ แอลฟาไกลูโคซิเดส และ อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

ABSTRACT

Phytochemical investigation of *Clausena harmandiana* leaves led to the isolation and identification of six known compounds; methyl carbazole-3-carboxylate (1), clausemine D (2), clausine F (3), heptaphylline (4), *p*-anethole (5) and *p*-methoxybenzoic acid (6). All structures were characterized by mainly ^1H NMR spectral data as well as comparison with the reported known compounds. Crude extract and carbazole alkaloids 1-4 were also evaluated for antibacterial, antioxidant, α -glucosidase inhibitory and acetylcholinesterase inhibitory activities.

คำสำคัญ: จันทน์หอม คาร์บาโซลแอลคาลอยด์ พืชวงศ์ส้ม

Keywords: *Clausena harmandiana*, carbazole alkaloids, Rutaceae

บทนำ

จันทน์หอม (*Clausena harmandiana*)
เป็นพืชอยู่ในวงศ์ส้ม (Rutaceae)

น้ำตาลเข้มข้น ใบประกอบมีลักษณะขนนกปลายคี่ เรียง
สลับ ใบรวมมีใบย่อย 3-7 ใบ ใบสีเขียวเข้ม ผิวใบมัน
มีจุดน้ำมันกระจายและจุดโปร่งใส สามารถส่องทะลุไป

อีกด้านได้ ขอบใบมีรอยหยักแบบฟันเลื่อยห่าง ซ่อดอกแบบแยกแขนง เกิดที่ปลายยอด ดอกเดี่ยวสีเหลืองอมเขียวอ่อนๆ อับเรณูสีเหลือง ผลเป็นรูปกลม ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่เป็นสีชมพูขาว (Swingle et al., 1967)

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิชาการพบว่ามีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ (Sriphana et al., 2013; Maneerat et al., 2012; Songsiang et al., 2011, Thongthoom et al., 2010; Yenjai et al., 2000; Wangboonskul et al., 1984), คูมาริน (Thongthoom et al., 2010; Yenjai et al., 2000; Wangboonskul et al., 1984) และเฟอรูลิท (Thongthoom et al., 2010) จากส่วนต่างๆ ของจันทน์หอม โดยสารประกอบที่แยกได้บางชนิดแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น clausamine B ที่แยกได้จากกิ่งจันทน์หอม (Maneerat et al., 2012) แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1 (MRSA SK1) อยู่ในระดับดีมากโดยมีค่า MIC 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ clausine F แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* และ MRSA SK1 ในระดับดีโดยมีค่า MIC เป็น 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ นอกจากนี้ heptaphylline และ 7-methoxy-heptaphylline ที่แยกได้จากส่วนราก (Sriphana et al., 2011) ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และมะเร็งทรวงอก (KB) ในระดับดีโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.3-2.7 μM และยังพบว่า 7-methoxyheptaphylline ไม่มีความเป็นพิษต่อ เซลล์ปกติ (Vero cells)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คณะนักวิจัยได้เลือกทำการศึกษาในส่วนใบของต้นจันทน์หอม ซึ่งจากการสืบค้นเอกสารทางวิชาการในฐานข้อมูล SciFinder Scholar พบว่าส่วนใบของต้นจันทน์หอมยังไม่มีมีการ

รายงานองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน



รูปที่ 1 ใบ ดอก ผล และลำต้นจันทน์หอม

วิธีการดำเนินการวิจัย

พืชตัวอย่าง

ใบจันทน์หอม เก็บจากจังหวัดเชียงราย ปี พ.ศ. 2554 และได้รับการระบุชนิดของพืช โดยอาจารย์ James Maxwell คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ดร. มณฑล นอแสงศรี องค์กรสวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ แม่ริม เชียงใหม่ โดยได้เก็บพรรณไม้แห้งไว้ที่หอพรรณไม้ องค์กรสวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ อำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ (หมายเลขพรรณไม้แห้ง QBG 45334) และห้องปฏิบัติการวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง (หมายเลขพรรณไม้แห้ง MFU-NPR0001)

การสกัดและการแยกสาร

นำใบจันทน์หอมแห้ง (519.2 กรัม) ที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆมาสกัดด้วยอะซิโตน จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 3 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้การลดความดัน ได้ส่วนสกัดหยาบอะซิโตน (62.8 กรัม) และนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็วโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวชะและเพิ่มความเข้มข้นด้วยเอทิลอะซิเตท ได้สารบริสุทธิ์ 5 (3.8 มิลลิกรัม) และ 10 ส่วนย่อย (3EKR1B-3EKR1K) นำส่วนย่อย 3EKR1D-3EKR1E (9.7 กรัม) มารวมกันและแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 15% อะซิโตน-เฮกเซน เป็นตัวชะได้ 3 ส่วนย่อย (3EKR4A-3EKR4C) นำส่วนย่อย

3EKR4B (64.7 มิลลิกรัม) แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 60% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน เป็นตัวชะได้สาร 6 (7.8 มิลลิกรัม) นำส่วนย่อย 3EKR1F (3.27 กรัม) แยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% เมทานอลเป็นตัวชะได้ 5 ส่วนย่อย (3EKR3A-3EKR3E) นำส่วนย่อย 3EKR3C (92.7 มิลลิกรัม) แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 40% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน เป็นตัวชะได้สารบริสุทธิ์ 1 (3.1 มิลลิกรัม) และ 4 (2.2 มิลลิกรัม) นำส่วนย่อย 3EKR1G-3EKR1I (234.7 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% เมทานอล เป็นตัวชะได้ 3 ส่วนย่อย (3EKR3F-3EKR3H) นำส่วนย่อย 3EKR3G (34.2 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 25% อะซิโตน-เฮกเซนเป็นตัวชะที่ได้สารบริสุทธิ์ 2 (5.7 มิลลิกรัม) และ 3 (5.0 มิลลิกรัม)

สารประกอบ 1: ของแข็งสีขาว (mp. 186-187 °C), UV (MeOH) λ_{\max} 231, 241, 276, 304, 328, 353 nm. IR (neat) ν_{\max} 3288, 2952, 1686, 1246 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8.82 (1H, brs, H-4), 8.14 (1H, d, $J = 8.0$, H-5), 8.13 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-2), 7.41 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1), 7.27 (1H, m, H-6), 7.44 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.42 (1H, m, H-7), 3.98 (3H, s, 3-CO₂Me), 8.30 (1H, br s, 9-NH). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6): 167.9 (3-CO₂Me), 142.3 (C-9a), 139.8 (C-8a), 127.4 (C-2), 126.5 (C-7), 123.4 (C-5a), 123.0 (C-4a), 122.9 (C-4) 121.5 (C-3), 120.6 (C-5), 120.3 (C-6), 110.9 (C-8), 110.1 (C-1), 51.9 (3-CO₂Me).

สารประกอบ 2: ของแข็งสีเหลืองอ่อน (mp. 192-193 °C), UV (MeOH) λ_{\max} 240, 251, 256, 268, 309, 322, 326 nm. IR (neat) ν_{\max} 3386,

1685, 1240 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8.13 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.48 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.45 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.26 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 5.29 (1H, m, H-2'), 4.31 (2H, d, $J = 4.5$ Hz, H-1'), 4.02 (3H, s, 1-OMe), 3.93 (3H, s, 3-CO₂Me), 1.91 (3H, s, H-4'), 1.71 (3H, s, H-5'), 8.41 (1H, br s, 9-NH)

สารประกอบ 3: ของแข็งสีเหลืองอ่อน (mp. 198-199 °C), UV (MeOH) λ_{\max} 208, 224, 241, 269, 312, 324, 338 nm. IR (neat) ν_{\max} 3381, 2924, 1689, 1586, 1455, 1340, 1237 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6): 8.94 (1H, brs, 1-OH), 8.15 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.51 (1H, s, H-2), 7.46 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.25 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 5.28 (1H, m, H-2'), 4.36 (2H, d, $J = 4.6$ Hz, H-1'), 3.87 (3H, s, 3-CO₂Me), 1.93 (3H, s, H-4'), 1.71 (3H, s, H-5'), 10.84 (1H, br s, 9-NH). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6): 169.1 (3-CO₂Me), 141.3 (C-8a), 141.2 (C-1), 132.7 (C-9a), 132.0 (C-3'), 126.3 (C-4), 126.2 (C-7), 124.6 (C-4b) 124.2 (C-4a and C-2'), 123.7 (C-5), 120.3 (C-6), 112.3 (C-2), 51.8 (3-CO₂Me), 29.1 (C-1'), 25.8 (C-5'), 18.4 (C-4').

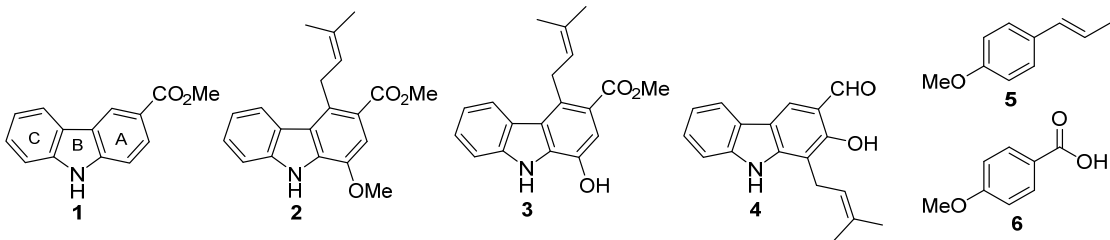
สารประกอบ 4: ของแข็งสีเหลืองอ่อน (mp. 172-173 °C), UV (MeOH) λ_{\max} 236, 250, 277, 298, 342 nm. IR (neat) ν_{\max} 3313, 1613, 1474, 1329, 1230 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 11.65 (1H, s, 2-OH), 9.92 (1H, s, 3-CHO), 8.05 (1H, s, H-4), 7.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.40 (1H, brs, H-8), 7.38 (1H, m, H-7), 7.28 (1H, m, H-6), 5.34 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 3.63 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 1.90 (3H, s, H-4'), 1.77 (3H, s, H-5'),

8.42 (1H, br s, 9-NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 195.4 (3-CHO), 157.8 (C-2), 145.0 (C-9a), 140.1 (C-8a), 134.2 (C-3'), 125.8 (C-7), 125.3 (C-4), 123.6 (C-4b), 121.2 (C-2'), 120.8 (C-5), 119.8 (C-6), 117.3 (C-3), 115.4 (C-4a), 110.8 (C-8), 109.0 (C-1), 25.7 (C-4'), 22.8 (C-1'), 18.1 (C-5').

สารประกอบ 5: ของหนืดไม่มีสี, UV (MeOH) λ_{max} 203, 252 nm. IR (neat) ν_{max} 1457 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.27 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' และ H-5'), 6.84 (2H, d, $J = 8.8$ Hz,

H-2' และ H-6'), 6.35 (1H, brt, $J = 15.6$ Hz, H-1), 6.08 (1H, m, H-2), 3.87 (3H, s, 4'-OMe), 1.87 (3H, dd, $J = 6.45, 1.29$ Hz, H-3).

สารประกอบ 6: ของแข็งสีขาว (mp. 186-187 °C), UV (MeOH) λ_{max} 203, 229, 260 nm. IR (neat) ν_{max} 1705, 1457 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2 และ H-6), 6.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3 และ H-5), 3.88 (3H, s, 4'-OMe)



รูปที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบ 1-6

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ คือ *Bacillus cereus* TISTR 688, *B. subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใช้วิธี broth micro dilution มีวิธีการโดยย่อดังนี้ เติมน้ำ Mueller-Hinton Broth ปริมาตร 50 μL ลงในไมโครเพลทตั้งแต่หลุมที่ 2-11 และปริมาตร 74.4 μL ที่หลุมที่ 1 และ 100 μL ที่หลุม 12 ตามลำดับ ดูตัวอย่างที่จะทำการทดสอบหรือยาต้านจุลชีพ (vancomycin หรือ gentamycin) ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 25.6 μL ลงในไมโครเพลทหลุมที่ 1 ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นดูผลการละลายจากหลุมที่ 1 ไปใส่หลุมที่ 2 ปริมาตร 50 μL ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (two fold dilution) จนถึงหลุมที่

10 เติมน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 50 μL ใส่ลงในหลุมที่ 1-11 โดยหลุมที่ 11 จะเป็น positive control และหลุมที่ 12 เป็น negative control แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง เติมน้ำละลาย 0.18% resazurin ปริมาตร 10 μL ทุกหลุมผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 2-3 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองโดยสังเกตจากหลุมที่มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ ส่วนหลุมที่มีการแสดงผลเป็นสีชมพู แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ จากนั้นบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ เป็นค่า MIC (Wikler et al., 2006)

การทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

เตรียมสารละลายของสารบริสุทธิ์และส่วนสกัดหยาบ, สารควบคุมผลบวก (positive control,

acarbose) และสารตั้งต้น (substrate, 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) ใน 50 μ M ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่มีส่วนผสมของ 5% v/v DMSO จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง หรือสารควบคุมผลบวกปริมาตร 20 μ L ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (Microcentrifuge tubes) และดูดสารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (0.35 U/mL) ปริมาตร 20 μ L ลงไปในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีสารละลายของสารบริสุทธิ์และส่วนสกัดหยาบหรือสารควบคุมผลบวก โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารตั้งต้นปริมาตร 10 μ L ลงไปในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ของสารผสม โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M Na_2CO_3 ปริมาตร 1 mL เพื่อยุติการทำงานของเอนไซม์ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 405 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่า IC_{50} (Liu et al., 2006, Ryu et al., 2011, Li et al., 2011 and Liu et al., 2008)

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

โดยการทำให้สารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (น้ำ เอทานอล เมทานอล หรือ DMSO) แล้วบีบอัดสารละลายตัวอย่าง 100 μ L ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH (ความเข้มข้น 60 μ M) 100 μ L ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้น ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 nm และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{blank}}] \times 100$$

จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทำให้เกิดการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% (IC_{50}) จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของตัวอย่าง (Kanlayavattanukul et al., 2011, Lourith et al., 2009)

การทดสอบเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC)

โดยสารตัวอย่างทั้งหมดละลายใน เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mM ส่วนสารมาตรฐาน Galantamine ใช้เพียง 2 ความเข้มข้นที่ 0.1 และ 0.01 μ M หลังจากเอาสารตัวอย่างลงในแผ่น TLC เรียบร้อยแล้วนำมาจุ่มในตัวเคลื่อนที่เหมาะสม วางแผ่น TLC ให้แห้งแล้วพ่นด้วยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (ที่ 3 U/mL ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH 7.8) หลังจากนั้นบ่มแผ่น TLC ที่ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาพ่นด้วยของผสม DTNB/ATCI (อัตราส่วน 1:1 ของ 1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) และ 1 μ M acetylthiocholine iodide) จนซิลิกาเจลอิมมัว สารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งจะปรากฏเป็นจุดสีขาว (Kyung et al., 2001)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบจันทร์หอม สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้ว โดยแบ่งเป็นสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์จำนวน 4 ชนิด ฟีนิลโพรพานอยด์ 1 ชนิด และอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก 1 ชนิด โครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 6 ชนิดวิเคราะห์โดยอาศัยข้อมูล ^1H NMR และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาแล้ว

สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ที่แยกได้จากส่วนใบทั้ง 4 ชนิด แสดงแถบการดูดกลืนแสงยูวีมากที่สุดในช่วง 230-390 nm สำหรับสัญญาณ IR จะ

แสดงแถบการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน OH และ NH ในช่วง 3300-3500 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ (Maneerat et al., 2012) สัญญาณ ^1H NMR ของ NH โปรตอนในช่วง δ_H 8.3–10.6 (รูปที่ 3) คาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 1-3 ยังแสดงสัญญาณ ^1H NMR ของ methyl ester ที่ตำแหน่ง C-3 โดยปรากฏสัญญาณที่ δ_H 3.9 ในขณะที่คาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 4 จะเป็นหมู่ formyl โดยปรากฏสัญญาณ ^1H NMR ที่ δ_H 9.92 สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ทุกตัวที่แยกได้จะแสดงลักษณะเฉพาะของสัญญาณ ^1H NMR แบบ 1,2-disubstituted aromatic ring ที่ δ_H 8.0 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.5 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.4 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7), และ 7.2 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6)

สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 1 มีโครงสร้างแบบไม่ซับซ้อนโดยมีหมู่แทนที่บนวงแหวนคาร์บาโซลแอลคาลอยด์เพียงตำแหน่งเดียวที่ C-3 ซึ่งเป็นหมู่ methyl ester (CO_2Me) โดยปรากฏสัญญาณ ^1H NMR ที่ δ_H 3.98 (3H, s) วงแหวน B ปรากฏสัญญาณเป็นแบบ ABX ที่ δ_H 8.82 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-4), 8.13 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-2) และ 7.44 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1) (Li et al., 1991)

สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 2 ปรากฏสัญญาณ ^1H NMR ของ aromatic proton ที่ δ_H 7.45 (1H, s) หมู่ isoprenyl ที่ δ_H 5.29 (1H, m, H-2'), 4.31 (2H, d, $J = 4.5$ Hz, H-1'), 1.91 (3H, s, H-4'), 1.71 (3H, s, H-5') และหมู่ methoxyl ที่ δ_H 4.02 (3H, s) โดยหมู่ isoprenyl เกาะที่ตำแหน่ง C-4 เนื่องจากผล anisotropic จากหมู่คาร์บอนิลของ methyl ester ที่ตำแหน่ง C-3 ส่งผลให้ methylene โปรตอนที่ δ_H 4.31 (H-1') ของหมู่ isoprenyl เกิดการเรโซแนนซ์ที่สนามต่ำกว่าปกติ สำหรับหมู่

methoxyl (δ_H 4.02) และ aromatic โปรตอน (δ_H 7.45) อยู่ที่ตำแหน่ง C-1 และ C-2 ตามลำดับ โดยการเปรียบเทียบข้อมูลกับสารประกอบที่ได้มีการรายงานมาแล้ว (Ito et al., 2009)

สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 3 ปรากฏสัญญาณ ^1H NMR คล้ายกับสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 2 ยกเว้นสารประกอบ 3 ไม่แสดงสัญญาณของหมู่ methoxyl ที่ C-1 ดังนั้น หมู่ methoxyl ที่ C-1 ของสารประกอบ 2 จึงถูกแทนที่ด้วยหมู่ hydroxy สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 3 (Wu et al., 1992)

สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 4 ปรากฏสัญญาณ ^1H NMR ของ chelated hydroxy proton ที่ δ_H 11.65 (1H, s), หมู่ formyl proton ที่ δ_H 9.92 (1H, s) และ aromatic proton ที่ δ_H 8.05 (1H, s) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของหมู่ isoprenyl ที่ δ_H 5.34 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 3.63 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 1.90 (3H, s, H-4'), 1.77 (3H, s, H-5') จากการเปรียบเทียบสัญญาณ ^1H NMR ของ aromatic proton ของวงแหวน B และ H-1' ของสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 2 และ 4 พบว่าสารประกอบทั้งสองมีเรโซแนนซ์สัญญาณ ^1H NMR ของ หมู่ methylene และ aromatic proton ของ H-2' ในสนามที่ต่างกันที่ δ_H 4.02 และ 7.45 ตามลำดับ สำหรับสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ จะปรากฏสัญญาณที่ δ_H 3.63 และ 8.05 ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า aromatic proton และหมู่ isoprenyl ของสารประกอบ 4 มีตำแหน่งที่ต่างจากสารประกอบ 2 โดยสามารถระบุตำแหน่งเป็นดังนี้ หมู่ isoprenyl เชื่อมต่อวงแหวนคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ที่ตำแหน่ง C-1 สำหรับ aromatic proton จะต่ออยู่กับ C-4 สำหรับหมู่ hydroxy จะ

เกาะอยู่ที่ C-2 เนื่องจากสัญญาณของหมู่ hydroxy แสดงการ chelation กับหมู่คาร์บอนิลของหมู่ formyl (Kumar et al., 1995)

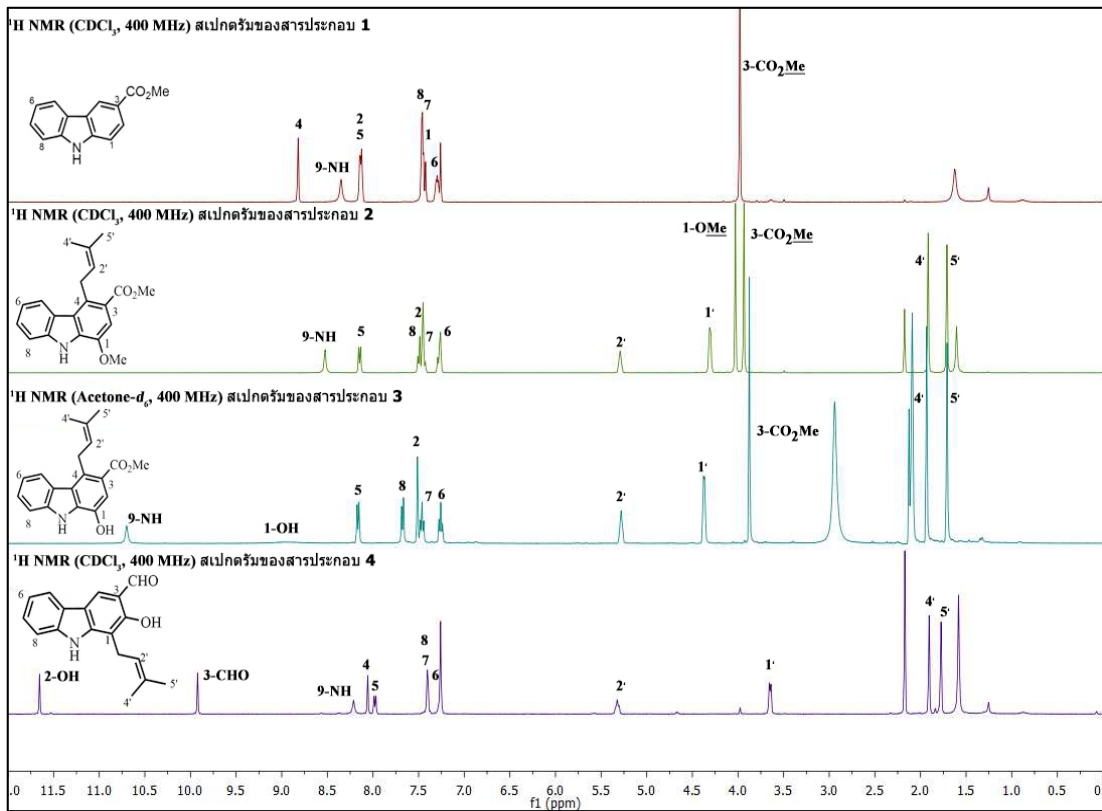
จากข้อมูลดังกล่าวและเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 1-4 คือ methyl carbazole-3-carboxylate (Li et al., 1991), clausemine D (Ito et al., 2000), clauseine F (Wu et al., 1992), และ heptaphylline (Kumar et al., 1995) ตามลำดับ สารประกอบทุกตัวได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR กับสารที่ได้มีการรายงานมาแล้ว

สารประกอบ 5 เป็นสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ จากข้อมูล ^1H NMR (รูปที่ 4) ฟีนิลโพรพานอยด์ 5 มีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อน โดยแสดงสัญญาณ ^1H NMR ของวงแหวนแอรอมาติกที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่ เป็นแบบพารา ที่ δ_{H} 7.27 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' และ H-5') และ 6.84 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' และ H-6') สัญญาณของหมู่ propylenyl ที่ δ_{H} 6.35 (1H, br t, $J = 15.6$ Hz, H-1), 6.08 (1H, m, H-2) และ 1.87 (3H, dd, $J = 6.5, 1.3$ Hz, H-3) สำหรับสัญญาณหมู่ methoxylปรากฏที่ δ_{H} 3.87 (3H, s) จากข้อมูลดังกล่าวสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ 5 คือ *p*-anethole (Hossain et al., 2008)

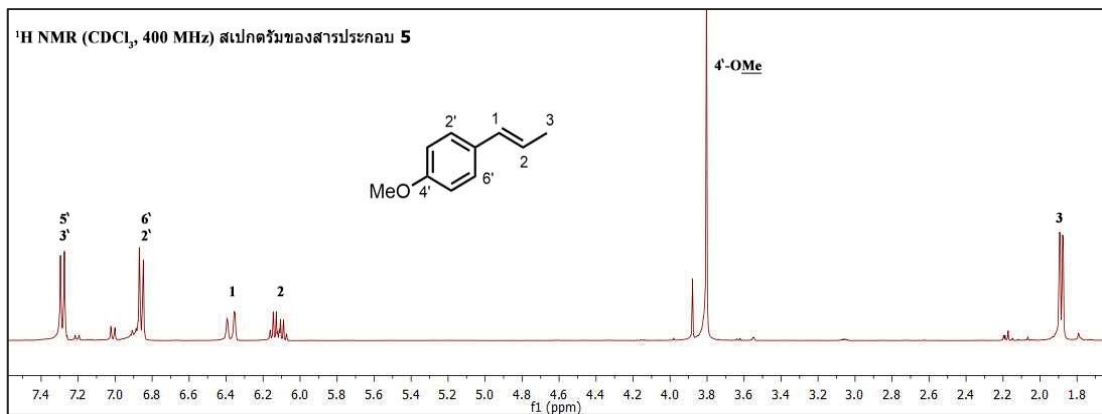
สารประกอบ 6 เป็นสารประกอบอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก จากข้อมูล ^1H NMR (รูปที่ 5)

สารประกอบ 6 มีลักษณะที่คล้ายกับฟีนิลโพรพานอยด์ โดยแสดงสัญญาณ ^1H NMR ของวงแหวนแอรอมาติกที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่เป็นแบบพารา ที่ δ_{H} 8.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2 และ H-6) และ 6.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3 และ H-5) สำหรับสัญญาณหมู่ methoxyl ปรากฏที่ δ_{H} 3.88 (3H, s) จากข้อมูลดังกล่าว สารประกอบ 6 คือ *p*-methoxybenzoic acid (Shimoni et al., 2002)

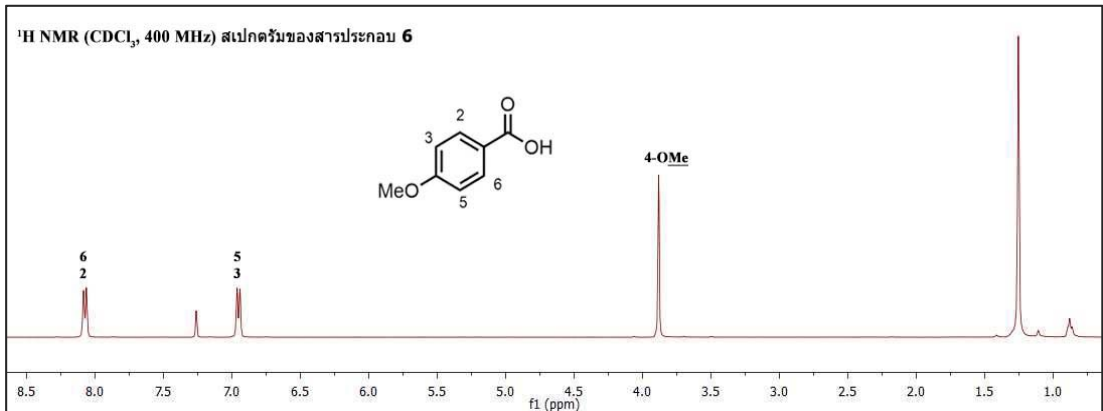
สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 1-4 ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) คือ *B. cereus* TISTR 688, *B. subtilis* TISTR 008, *S. epidermidis* ATCC 12228, และ *Ps. aeruginosa* TISTR 781 โดยพบว่าสารประกอบทุกชนิดแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในระดับต่ำ (MIC = 128 $\mu\text{g/mL}$) หรือไม่แสดงฤทธิ์เลย (MIC มากกว่า 128 $\mu\text{g/mL}$) สำหรับฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันพบว่ามีเฉพาะสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 3 ที่แสดงฤทธิ์ได้ดีโดยมีค่า IC_{50} เป็น 2.85 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งอยู่ในระดับที่เทียบเคียงได้กับสารมาตรฐาน (วิตามิน C, $\text{IC}_{50} = 2.41$ $\mu\text{g/mL}$) สารประกอบทุกตัวและส่วนสกัดหยาบ เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ acetylcholinesterase พบว่า ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ acetylcholinesterase



รูปที่ 3 ¹H NMR (400 MHz) สเปกตรัมของสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 1-4



รูปที่ 4 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) สเปกตรัมของ *p*-anethole (5)



รูปที่ 5 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) สเปกตรัมของ *p*-methoxybenzoic acid (6)

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันของสารประกอบ 1-4

สารประกอบ	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC, µg/mL)				ฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน	
	BC	BS	SE	PA	% Inhibition	IC ₅₀ , µg/mL
1	>128	>128	>128	>128	7.32	-
2	>128	>128	>128	>128	7.06	-
3	128	not tested	128	64	89.75	2.85
4	>128	>128	>128	>128	40.57	-
Vancomycin	0.25	0.25	0.25	-	-	-
Gentamycin	-	-	-	2.0	-	-
ascorbic acid	-	-	-	-	-	2.41

BC = *B. cereus*; BS = *B. subtilis*; SE = *S. epidermidis*; PA = *Ps. Aeruginosa*

สรุปผลการวิจัย

พืชสกุล *Clausena* เป็นแหล่งผลิตที่สำคัญของสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์โดยมีการค้นพบแล้วมากกว่า 100 ชนิด (Maneerat et al., 2012; Thongthoom et al., 2010; Yenjai et al., 2000; Thuy et al., 1999; Shen et al., 2012; Okorie et al., 1975; Ngadjui et al., 1989; Songue et al., 2012; Ito et al., 2009) โดยในการศึกษาค้นพบนี้สามารถแยกสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ได้ 4 ชนิด ซึ่งเป็นการค้นพบเป็นครั้งแรกจากส่วนใบของจันทน์หอม แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านการ

ออกซิเดชันของสารเหล่านี้พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่แสดงฤทธิ์ ยกเว้นสารประกอบ 3 จะแสดงฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันได้ดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน สารทุกชนิดและส่วนสกัดหยาบไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส และ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัยและขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีบางส่วนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Hossain, M. A., Ismail, Z., Rahman, A., and Kang, S. C. (2008). Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. Ind. Crop. Prod. 27: 328-334.
- Ito, C., Itoigawa, M., Katsuno, S., Omura, M., Tokuda, H., Hishino, H. and Furukawa, H. (2000). Chemical constituents of *Clausena excavata*. Isolation and structure elucidation of novel furano-coumarins with inhibitory effects of tumor-promotion. J. Nat. Prod. 63: 1218-1224.
- Ito, C., Itoigawa, M., Aizawa, K., Yoshida, K., Ruangrunsi, N. and Furukawa, H. (2009). γ -Lactone carbazoles from *Clausena anisata*. J. Nat. Prod. 72: 1202-1204.
- Kanlayavattanukul, M. and Lourith, N. (2011). Sapodilla seed coat as a multifunctional ingredient for cosmetic applications. Process Biochemistry 46: 2215-2218.
- Kumar, V., Vallipuram, K., Adebajo, A. C. and Reisch, J. (1995). 2,7-Dihydroxy-3-formyl-1-(3-methyl-2-butenyl)carbazole from *Clausena lansium*. Phytochemistry 40: 1563-1565.
- Kyung, I. R., van de Meent, M., Ingkaninang, K., and Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. J. Chromatogr. A 915: 217-223.
- Li, W. S., McChesney, J. D. and El-Feraly, F. S. (1991). Carbazole alkaloids from *Clausena lansium*. Phytochemistry 30: 343-346.
- Li, G. L., He, J. Y., Zhang, A., Wan, Y., Wang, B. and Wang, W. H. (2011). Toward potent α -glucosidase inhibitors based on xanthenes: A closer look into the structure-activity correlations. European J. Med. Chem. 46: 4050-4055.
- Liu, Y., Zou, Y., Ma, L., Chen, W. H., Wang, B. and Xu, Z. L. (2006). Synthesis and pharmacological activities of xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 14: 5683-5690.
- Liu, Y., Ke, Z., Cui, J., Chen, W. H., Ma, L. and Wang, B. (2008). Synthesis, inhibitory activities, and QSAR study of xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 16: 7185-7192.
- Lourith, N., Kanlayavattanukul, M. and Chanpirom, S. (2009). Free radical scavenging efficacy of Tamarind seed coat and its cosmetics application. J. Health Res. 23: 159-162.
- Maneerat, W., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S. and Laphookhieo, S. (2012). Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs. Fitoterapia 83: 1110-1114.
- Maneerat, W., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Deachathai, S. and Laphookhieo, S. (2013). Phenylpropanoid derivatives from *Clausena harmandiana* fruits. Phytochemistry Lett. 6: 18-20.
- Ngadjui, B. T., Ayafor, J. F., Sondengam, B. L. and Connolly, J. D. (1989). Quinolone and carbazole alkaloids from *Clausena anisata*. Phytochemistry 28: 1517-1519.
- Okorie, D. A. (1975). A new carbazole alkaloid and coumarins from roots of *Clausena anisate*. Phytochemistry 14: 2720-2721.
- Ryu, H. W., Cho, J. K., Curtis-Long, M. J., Yuk, H. J., Kim, Y. S., Jung, S., Kim, Y. S., Lee, B. W. and Park, K. H. (2011). α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated

- xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 72: 2148–2154.
- Shen, D. Y., Chao, C. H., Chan, H. H., Huang, G. J., Hwang, T. L., Lai, C. Y., Lee, K. H., Thang, T. D. and Wu, T. S. (2012). Bioactive constituents of *Clausena lansium* and a method for discrimination of aldose enantiomers. *Phytochemistry* 82: 110–117.
- Shimoni, E., Baasov, T., Ravid, U. and Shoham, Y. (2002). The *trans*-anethole degradation pathway in an *Arthrobacter* sp. *J. Biol. Chem.* 277: 11866–11872.
- Songue, J. L., Dongo, E., Mpondo, T. N. and White, R. L. (2012). Chemical constituents from stem bark and roots of *Clausena anisata*. *Molecules* 17: 12673–12686.
- Songsiang, U., Thongthoom, T., Boonyarat, C. and Yenjai, C. (2011). Claurailas A–D, Cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *J. Nat. Prod.* 74: 208–212.
- Sriphana, U., Thongsri, Y., Prariyachatigul, C., Pakawatchai, C. and Yenjai, C. (2013). Clauraila E from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. *Arch. Pharm. Res.* 36: 1078–1083.
- Swingle, W. T. and Reece, P. C. (1967). The citrus industry. University of California, Division of Agricultural Sciences. Retrieved Jun 2012, แหล่งข้อมูล : <http://websites.lib.ucr.edu/agnic/webber/Vol1/Chapter3.html> ค้นเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2558.
- Thongthoom, T., Songsiang, U., Phaosiri, C. and Yenjai, C. (2010). Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Arch. Pharm. Res.* 33: 675–80.
- Thuy, T. T., Ripberger, H., Porzel, A., Sung, T. V. and Adam, G. (1999). Coumarins, limonoids and an alkaloid from *Clausena excavata*. *Phytochemistry* 52: 511–516.
- Wangboonskul, J., Pummangura, S. and Chaichantipyuth, C. (1984). Five coumarins and a carbazole alkaloid from the root bark of *Clausena harmandiana*. *J. Nat. Prod.* 47:1058.
- Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Hindlar, J. F., Low, D. E., Sheehan, D. J., Tenover, F. C., Turnidge, J. D., Weinstein, M. P., Zimmer, B. L., Ferraro, M. J. and Swenson, J. M. (2006). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7-A7*. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. Vol. 2, No. 2.
- Wu, T. S., Huang, S. C. and Lai, J. S. (1992). Limonoids from the stem bark of *Clausena excavata*. *J. Chin. Chem. Soc.* 40: 319–320.
- Yenjai, C., Sripontan, S., Sriprajun, P., Kittakoop, P., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. (2000). Antimalarials from *Clausena harmandiana*. *Planta Med.* 66: 277–279.

