บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้

สเปคตรัม : Nuclear Mangnetic Resonance (NMR) Spectra บันทึกด้วยเครื่อง FT-NMR 500 MHz Varian UNITY INOVA โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิง บอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ด้วย chemical shift parameter, δ(ppm)

จุดหลอมเหลว : วัดด้วยเครื่อง Electrothermal 9100 Melting Point มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส (^{0}ซ)

โครมาโทกราฟี : คอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจล (silica gel) ของบริษัท Merck ชนิด 100 (70-230 mesh ASTM) โครมาโทกราฟีแผ่นบางและโครมาโทกราฟีแผ่นหนา ใช้ซิลิกาเจล (silica gel) 60 PF_{254} เป็นตัวดูดซับ

ค่าการดูดกลืนแสง : วัดด้วยเครื่อง spectronic 21 (MILTON ROY)

ตัวทำละลาย : เฮกเซน เมธิลินคลอไรด์ เอธิลอะซิเทต อะซิโตน และเมธานอล ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์เป็นชนิด เออาร์ (analytical grade)

Hydroiodic acid 47% (บริษัท Fluka)

Hydrobromic acid (บริษัท Baker)

Sodium hydride (บริษัท Fluka)

N,N-dimethylformamide (บริษัท Carlo Erba)

N,N-dimethylaminopropylchloride hydrochloride (บริษัท Fluka)

N,N-dimethylaminoethylchloride hydrochloride (บริษัท Fluka)

Epichlorohydrin (บริษัท Fluka)

Dimethylamine (บริษัท Fluka)

Diethylamine (บริษัท Merck)

Hexane (analytical reagent) (บริษัท Lab-scan)

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (บริษัท Fluka)

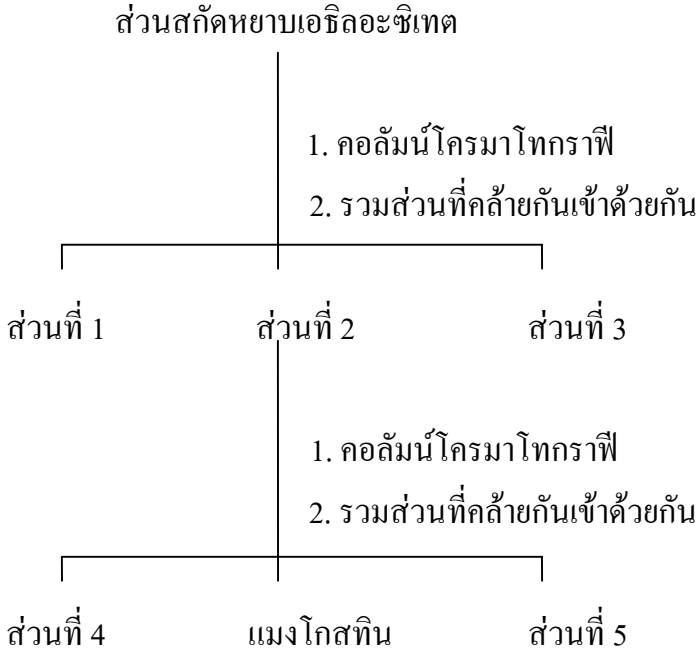
Ethanol absolute (บริษัท Merck)

2.2 การทดลอง

2.2.1 การสกัดและแยกแมงโกสทินจากมังคุด

ทำการสกัดและแยกแซนโทนที่เป็นองค์ประกอบหลักจากมังคุดซึ่งได้แก่ แมงโกสทิน โดยนำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเทตของมังคุด (15 กรัม) มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและชะคอลัมน์ด้วย เฮกเซน-เมธิลีนคลอไรด์ และเมธิลีนคลอไรด์ ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายออกพอสมควร ตรวจดูส่วนที่ชะได้ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง รวมส่วนที่คล้ายกันเข้าด้วยกัน ได้ส่วนที่ 1 ส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 นำส่วนที่ 2 ซึ่งมีแมงโกสทินเป็นสารหลักมาระเหยตัวทำละลายออกแล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์อีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน-เมธิลีนคลอไรด์ และเมธิลีนคลอไรด์ ได้แมงโกสทินบริสุทธิ์ (10 กรัม) จุดหลอมเหลว 179-181 ^{0}ซ

400 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.80 (*s*, 1H), 6.82 (*s*, 1H), 6.31 (*s*, 1H), 6.28 (*s*, 1H), 6.16 (*s*, 1H), 5.28 (*m*, 2H), 4.11-4.10 (*d*, 2H), 3.81 (*s*, 3H), 3.47-3.44 (*d*, 2H), 1.84 (*d*, 6H), 1.78 (*s*, 3H), 1.70 (*s*, 3H)



รูปที่ 3 วิธีการสกัดและแยกแมงโกสทินจากมังคุด

2.2.2 การสังเคราะห์ GMB-1 และ GMB-2

ละลายแมงโกสทิน (2.042 กรัม, 4.98 มิลลิโมล) ด้วย 47% กรดไฮโดรไอออดิก (15 มิลลิลิตร) และรีฟรักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำมากรอง ได้ตะกอนสีเหลือง นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยเมธิลีนคลอไรด์ แล้วล้างด้วยสารละลาย 1% โซเดียมคาร์บอเนตและน้ำ นำชั้นเมธิลีนคลอไรด์มาดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะคอลัมน์ด้วย 2% เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-2 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง (0.801 กรัม, 40.61%) จุดหลอมเหลว 176-179 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.76 (*s*, 1H), 6.79 (*s*, 1H), 6.40 (*s*, 1H), 6.25 (*s*, 1H), 3.50 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.71 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.88 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.39 (*s*, 6H), 1.37 (*s*, 6H)

และได้สาร GMB-1 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง (0.592 กรัม, 30.01%) จุดหลอมเหลว 175-177 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR (CD_3OD) δ ppm : 6.64 (*s*, 1H), 6.31 (*s*, 1H), 3.45 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.64 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.41 (*s*, 6H), 1.36 (*s*, 6H)

2.2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ GMB-1

2.2.3.1 3-hydroxy-3-(*N,N*-dimethylaminoethoxy)-di-[1,2-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-3)

เติมเฮกเซนให้ท่วมโซเดียมไฮไดร (0.245 กรัม, 10.20 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดเฮกเซนออกแล้วเติม dimethylformamide (5 มิลลิลิตร) คนของผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ละลาย GMB-1 (0.2007 กรัม, 5 x 10^{-1} มิลลิโมล) ใน dimethylformamide แล้วเติมลงในของผสมข้างต้น คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม *N,N*-dimethylaminoethylchloride hydrochloride (0.5409 กรัม, 3.74 มิลลิโมล) และคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแล้วสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วย 1% เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (6 มิลลิกรัม, 2.23%) จุดหลอมเหลว 173-175 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 6.74 (*s*, 1H), 6.34 (*s*, 1H), 4.17 (*t*, *J* 5 Hz, 2H), 3.58 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.83 (*t*, *J* 5 Hz, 2H), 2.66 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.40 (*s*, 6H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.45 (*s*, 6H), 1.36 (*s*, 6H)

2.2.3.2 3-hydroxy-3-(*N,N*-dimethylaminopropoxy)-di-[1,2-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-4)

เติมเฮกเซนให้ท่วมโซเดียมไฮไดร (0.234 กรัม, 9.75 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดเฮกเซนออกแล้วเติม dimethylformamide (3 มิลลิลิตร) คนของผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ละลาย GMB-1 (0.1115 กรัม, 2.81 x 10^{-1} มิลลิโมล) ใน dimethylformamide แล้วเติมลงในของผสมข้างต้น คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นเติม *N,N*-dimethylaminopropylchloride hydrochloride (0.2376 กรัม, 1.50 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแล้วสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วย 1% เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (7 มิลลิกรัม, 4.41 %) จุดหลอมเหลว 180-183 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 6.74 (*s*,1H), 6.35 (*s*, 1H), 4.10 (*t*, *J* 6.5 Hz, 2H), 3.58 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.65 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.54 (*t*, *J* 6.5 Hz, 2H), 2.32 (*s*, 6H), 2.05 (*qn*, *J* 7 Hz, 2H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.81 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.46 (*s*, 6H), 1.35 (*s*, 6H)

2.2.3.3 3,6-di-(2,3-epoxypropoxy)-di-[1,2-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano) xanthen-9-one (GMB-5) และ 3-hydroxy-3-(2,3-epoxypropoxy)-di-[1,2-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-6)

เติมเฮกเซนให้ท่วมโซเดียมไฮไดร (0.5455 กรัม, 22.72 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดเฮกเซนออกแล้วเติม dimethylformamide (5 มิลลิลิตร) คนของผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ละลาย GMB-1 (0.3186 กรัม, 8.04 x 10^{-1} มิลลิโมล) ใน dimethylformamide เติมลงในของผสมข้างต้น คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม epichlorohydrin (5 มิลลิลิตร, 63.76 มิลลิโมล) และคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแล้วสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมา

โทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-5 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (48.6 มิลลิกรัม, 13.44 %) จุดหลอมเหลว 186-188 ^{0}ซ และได้สาร GMB-6 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (83.7 มิลลิกรัม, 20.59 %) จุดหลอมเหลว 161-163 ^{0}ซ

สาร GMB-5 500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 6.75 (*s*, 1H), 6.31 (*s*, 1H), 4.38 (*dd*, 1H), 4.38 (*dd*, 1H), 4.08 (*dd*, 1H), 4.01 (*dd*, 1H), 3.57 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 3.42 (*m*, 2H), 2.95 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.82 (*m*, 2H), 2.69 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.80 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.46 (*s*, 6H), 1.36 (*s*, 6H)

สาร GMB-6 500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 6.74 (*s*, 1H), 6.33 (*s*, 1H), 4.36 (*dd*, 1H), 4.01 (*dd*, 1H), 3.58 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 3.42 (*m*, 1H), 2.95 (*t*, *J* 7 Hz, 1H), 2.82 (*dd*, 1H), 2.69 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.45 (*s*, 6H), 1.35 (*s*, 6H)

2.2.3.4 3,6-di-(2-hydroxy-3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)-di-[1,2-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-7)

ละลายสาร GMB-5 (40 มิลลิกรัม, 8.84 x 10^{-2} มิลลิโมล) ในเมธานอลเติม dimethylamine (2 มิลลิลิตร, 39.83 มิลลิโมล) รีฟลักซ์เป็นเวลา 1 วัน ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วย 2 % เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์และได้สาร GMB-7 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (29.2 มิลลิกรัม, 73.29 %) จุดหลอมเหลว 102-104 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 6.72 (*s*, 1H), 6.32 (*s*, 1H), 4.18 (*m*, 1H), 4.13 (*m*, 1H), 4.05-4.08 (*m*, 3H), 3.56 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.67 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.61 (*dd*, 2H), 2.50 (*dd*, 2H), 2.37 (*s*, 6H), 1.81 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.79 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.45 (*s*, 6H), 1.34 (*s*, 6H)

2.2.3.5 3,6-di-(2-hydroxy-3-*N,N*-diethylaminoethoxy)-di-[1,2-b],[7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-8)

ละลายสาร GMB-5 (20 มิลลิกรัม, 3.93 x 10^{-2} มิลลิโมล) ในเมธานอล เติม diethylamine (2 มิลลิลิตร, 19.33 มิลลิโมล) รีฟลักซ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วย 2% เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-8 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (6.5 มิลลิกรัม, 30.89 %) จุดหลอมเหลว 181-183 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 6.72 (*s*, 1H), 6.34 (*s*, 1H), 4.07 (*m*, 6H), 3.56 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.68 (*m*, 14H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.81 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.45 (*s*, 6H), 1.34 (*s*, 6H), 1.07 (*t*, *J* 7 Hz, 12H)

2.2.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ GMB-2

2.2.4.1 1-hydroxy-6-(*N,N*-dimethylaminoethoxy)-di-[2,3-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-9)

เติมเฮกเซนให้ท่วมโซเดียมไฮไดร (0.350 กรัม, 14.50 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดเฮกเซนออกแล้วเติม dimethylformamide (3 มิลลิลิตร) คนของผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ละลาย GMB-2 (0.2470 กรัม, 6.23 x 10^{-1} มิลลิโมล) ใน dimethylformamide แล้วเติมลงในของผสมข้างต้น คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม *N,N*-dimethylaminoethylchloride hydrochloride (0.432 กรัม, 2.99 มิลลิโมล) และคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแล้วสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-9 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (123 มิลลิกรัม, 42.48 %) จุดหลอมเหลว 159-161 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.79 (*s*, 1H), 6.72 (*s*, 1H), 6.24 (*s*, 1H), 4.19 (*t*, *J* 6.5 Hz, 2H), 3.50 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.85 (*t*, *J* 6.5 Hz, 2H), 2.72 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.38 (*s*, 6H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.37 (*s*, 12H)

2.2.4.2 1-hydroxy-6-(*N,N*-dimethylaminopropoxy)-di-[2,3-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-10)

เติมเฮกเซนให้ท่วมโซเดียมไฮไดร (0.255 กรัม, 10 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดเฮกเซนออกแล้วเติม dimethylformamide (4 มิลลิลิตร) คนของผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ละลาย GMB-2 (0.2271 กรัม, 5.73 x 10^{-1} มิลลิโมล) ใน dimethylformamide แล้วเติมลงในของผสมข้างต้น คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม *N,N*-dimethylaminopropychloride hydrochloride (0.467 กรัม, 2.9 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแล้วสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-10 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (28.9 มิลลิกรัม, 10.54 %) จุดหลอมเหลว 192-195 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.83 (*s*, 1H), 6.75 (*s*, 1H), 6.24 (*s*, 1H), 4.15 (*t*, *J* 6.5 Hz, 2H), 3.50 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.72 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.50 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.28 (*s*, 6H), 2.07 (*q*, 2H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.37 (*s*, 12H)

2.2.4.3 1-hydroxy-6-(2,3-epoxypropoxy)-di-[2,3-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-11)

เติมเฮกเซนให้ท่วมโซเดียมไฮไดร์ (1 กรัม, 41.66 มิลลิโมล) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดเฮกเซนออกแล้วเติม dimethylformamide (5 มิลลิลิตร) คนของผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ละลาย GMB-2 (0.6988 กรัม, 1.76 มิลลิโมล) ใน dimethylformamide แล้วเติมลงในของผสมข้างต้น คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม epichlorohydrin

(5 มิลลิลิตร, 63.76 มิลลิโมล) และคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแล้วสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ดูดซับน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองและระเหยเมธิลีนคลอไรด์ออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-11 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (0.3117 กรัม, 39.18 %) จุดหลอมเหลว 220-221 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.76 (*s*, 1H), 6.79 (*s*, 1H), 6.24 (*s*, 1H), 4.40 (*dd*, 1H), 4.08 (*dd*, 1H), 3.51 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 3.45 (*m*, 1H), 2.95 (*dd*, 1H), 2.83 (*dd*, 1H), 2.72 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.85 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.83 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.37 (*s*, 12H)

2.2.4.4 1-hydroxy-6-(2-hydroxy-3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)-di-[2,3-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-12)

ละลาย GMB-11 (0.1323 กรัม, 29.26 มิลลิโมล) ในเมธานอล เติม dimethylamine (2 มิลลิลิตร, 39.83 มิลลิโมล) รีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วย 1% เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-12 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (60.50 มิลลิกรัม, 41.97 %) จุดหลอมเหลว 151-152 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.77 (*s*, 1H), 6.78 (*s*, 1H), 6.24 (*s*, 1H), 4.19 (*m*, 1H), 4.10 (*m*, 2H), 3.50 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.71 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.59 (*dd*, 1H), 2.46 (*dd*, 1H), 2.35 (*s*, 6H), 1.82 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.84 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 1.37 (*s*, 12H)

2.2.4.5 1-hydroxy-6-(2-hydroxy-3-*N,N*-diethylaminoethoxy)-di-[2,3-b], [7,8-a]-(3,3-dimethylpyrano)xanthen-9-one (GMB-13)

ละลาย GMB-11 (0.1317 กรัม, 29.13 มิลลิโมล) ในเมธานอล เติม diethylamine (2 มิลลิลิตร, 19.33 มิลลิโมล) รีฟลักซ์เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ นำสารที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะ

คอลัมน์ด้วย 1% เมธานอลในเมธิลีนคลอไรด์ ได้สาร GMB-13 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (69.80 มิลลิกรัม, 34.74 %) จุดหลอมเหลว 123-125 ^{0}ซ

500 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 13.79 (*s*, 1H), 6.78 (*s*, 1H), 6.24 (*s*, 1H), 4.11 (*m*, 3H), 3.50 (*t*, *J* 7 Hz, 2H), 2.66 (*m*, 8H), 1.84 (2*t*, *J* 7 Hz, 4H), 1.37 (*s*, 12H), 1.07 (*t*, *J* 7 Hz, 6H)

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย DPPH

2.2.5.1 การเตรียมสารละลายเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เตรียม stock solution ของอนุพันธ์ต่าง ๆ ในความเข้มข้น 6.1 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลาย absolute ethanol

เตรียมสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ โดยละลาย DPPH ในตัวทำละลาย absolute ethanol

2.2.5.2 การทดสอบหาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

นำ stock solution ของสารตัวอย่างที่เตรียมได้ (50 ไมโครลิตร) ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH 0.05 มิลลิโมลาร์ (3 มิลลิลิตร) ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างจะเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}ซ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายชุดที่มีสารอนุพันธ์ และชุดที่มีแมงโกสทิน เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีสารตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่ 20 40 60 และ 80 นาที ทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าการดูดกลืนแสงแสดงในดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (517 นาโนเมตร)				
	0 นาที	20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที
ตัวควบคุม	0.400	0.400	0.390	0.390	0.380
Mangostin	0.390	0.300	0.290	0.275	0.260
GMB-1	0.400	0.390	0.390	0.380	0.370
GMB-2	0.390	0.370	0.360	0.340	0.340
GMB-3	0.390	0.370	0.350	0.340	0.340
GMB-4	0.390	0.350	0.330	0.310	0.290
GMB-5	0.400	0.400	0.400	0.390	0.390
GMB-6	0.400	0.400	0.390	0.380	0.380
GMB-7	0.400	0.390	0.380	0.380	0.380
GMB-8	0.390	0.340	0.310	0.300	0.280
GMB-9	0.400	0.380	0.370	0.370	0.360
GMB-11	0.400	0.380	0.370	0.360	0.350
GMB-12	0.400	0.400	0.390	0.380	0.380
GMB-13	0.400	0.400	0.380	0.380	0.380

2.2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ด้วยวิธี TBARS *

เตรียมสารตัวอย่างสำหรับทดสอบในปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยนำสารตัวอย่างแต่ละชนิดมาละลายในเอธานอล (absolute ethanol) แล้วจึงผสมกับสารละลาย LDL ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายวิตามินซี(ascorbic acid) และ 60 ไมโครโมลาร์ $FeSO_4$ ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}ซ ทันที จับเวลาเมื่อครบทุก ๆ 30 นาที จนกระทั่งครบ 6 ชั่วโมง ดูดสารละลายที่บ่มไว้ (ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร) ออกมา 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 2.1% ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันทันที หลังจากนั้นนำมาหาปริมาณสารประกอบ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) โดยการเติม 25% trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร 8% sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 1% thiobarbituric acid (TBA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80 ^{0}ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเย็นลงนำไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารตัวอย่างอยู่ด้วย จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นจากสารละลาย malondialdehyde (MDA) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6

*ทำการทดลองโดยคุณสุญาณี คงคาช่วย นักศึกษาปริญญาโทสาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์