

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแซนโทนจากกิ่งของ *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume
Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume

ธนศวร นวลไย^{1*}, เบญจมาศ ไชยลาภ¹, ทรงจันทร์ ภู่อทอง² และ อนุมาร บัวเขียว²

Thanesuan Nuanyai^{1*}, Benjamat Chailap¹, Songchan Puthong² and Anumart Buakeaw²

¹สาขาวิชาศึกษาทั่วไป คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล ตำบลหนองแก อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77110

²สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

บทคัดย่อ

จากการสกัดและแยกสารส่วนสกัดเฮกเซนส่วนกิ่งของตัวเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) สามารถแยกสารกลุ่มแซนโทนได้ทั้งหมด 6 ชนิด คือ 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isopropylxanthone (1), Cochinchinone A (2), 7-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (3), Dulcisxanthone B (4), β -mangostin (5) และ Dulcisxanthone F (6) สารบริสุทธิ์ทั้งหมดพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (¹H, ¹³C, COSY, HSQC และ HMBC) และเปรียบเทียบข้อมูลจากรายงานวิจัยก่อนหน้า จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่า ความมีขั้วส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และสาร 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isopropylxanthone (1) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดคือ มะเร็งเต้านม (BT-474), มะเร็งปอด (ChaGo-K-1), มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-620) โดยสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ร้อยละ 50 ของการเจริญเติบโต (IC₅₀) มากที่สุดที่ระดับ 1.05, 0.46, 0.46, 0.63 และ 3.11 μ g/mL ตามลำดับ

คำสำคัญ : ตัวเกลี้ยง, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Abstract

Six xanthenes; 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isopropylxanthone (1), Cochinchinone A (2), 7-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (3), Dulcisxanthone B (4), β -mangostin (5) and Dulcisxanthone F (6) were isolated from hexanes extract of twigs of

*E-mail address: Thanesuan.Nua@mutr.ac.th โทรศัพท์ : 032-618-500 ต่อ 4805 โทรสาร : 032-618-570

Cratoxylum cochinchinense. The structure of pure compounds were elucidated by basic NMR spectroscopy (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC) and compared with previous literature reviews. The structure activity relationship of these compounds displayed that the polarity of compounds played important role in cytotoxicity of five human cancer cell lines. Furthermore, 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isopropylxanthone (1) showed the most of the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of five human cancer cell lines; breast (BT-474), lung (ChaGo-K-1), liver (HepG2), gastric (KATO-III) and colon (SW-620) as 1.05, 0.46, 0.46, 0.63 and 3.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Keywords : *Cratoxylum cochinchinense*, Cytotoxicity

1. บทนำ

ตัวเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) เป็นพรรณไม้ในวงศ์ (Family) Hypericaceae ตัวเกลี้ยงเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้เป็นยาต่างๆ ตำรายาพื้นบ้านใช้ ต้น หรือราก ผสมล้าต้นกำแพงเจ็ดชั้น ต้ม น้ำดื่ม แก้กระษัยเส้น เป็นยาระบาย เปลือกต้น ใช้ทำสีย้อม ใบอ่อนและยอดอ่อนมีรสเปรี้ยวค่อนข้างฝาด รับประทานเป็นผักสด ไม้ ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการอยู่ไฟ ตำรายาไทย เปลือกต้น ใช้รักษาอาการเสียดท้อง หรืออาการเกี่ยวกับลำไส้ น้ำยางจากเปลือก ที่เปลี่ยนเป็นสีแดง ใช้รักษาโรคหิด ชาวมาเลเซีย ใช้ เปลือก และใบ ผสมกับน้ำมันมะพร้าวช่วยบำรุงผิว [1] จากรายงานการวิจัยพบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของ ตัวเกลี้ยง คือสารกลุ่มแซนโทนที่มีความหลากหลายของหมู่แทนที่ [2-7] สารแซนโทนเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง [4,7] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [3] เป็นต้น ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแซนโทนเหล่านี้ขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่ การที่หมู่แทนที่ที่มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสภาพความอุดมสมบูรณ์ของดินและสภาพภูมิอากาศ [8-10] เขตอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นที่ตั้งของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล ซึ่งมีสภาพภูมิประเทศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตัวเกลี้ยงสามารถพบตัวเกลี้ยงได้โดยทั่วไป จากสภาพภูมิประเทศเฉพาะตัวทำให้ โครงสร้างของสารเคมีที่อยู่ในตัวเกลี้ยงมีความแตกต่างจากแหล่งอื่น และทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพมีความแตกต่าง [11] ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์จากกิ่งของตัวเกลี้ยงต่อเซลล์ไลน์มะเร็ง 5 ชนิด คือ มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-620) มะเร็งปอด (ChaGo-K-1) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และมะเร็งเต้านม (BT-474) โดยวิธี MTT Assay เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาตัวยาในการรักษาโรคมะเร็งจากสมุนไพรไทยอีกทางหนึ่ง

2. วิธีการทดลอง

2.1 ตัวอย่างกิ่งตัวเกลี้ยง (*C. cochinchinense*)

ตัวอย่างกิ่งตัวเกลี้ยง (*C. cochinchinense*) เก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม 2556 บริเวณเขาหินปูน หลังมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล ได้ทำการเปรียบเทียบและพิสูจน์

พันธุ์ไม้เปรียบเทียบกับที่สำนักหอพรรณไม้ กรมป่าไม้ ตัวอย่างพืชชนิดแห้งได้ทำการเก็บรักษาที่หมวดวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาศึกษาทั่วไป คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวลตัวอย่าง No. Plant-004

2.2 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากกิ่งตัวเกลี้ยง (*C. cochinchinense*)

นำกิ่งของตัวเกลี้ยงหนัก 1.5 กิโลกรัม ตากแห้งและบดด้วยเครื่องบดเอนกประสงค์ นำตัวเกลี้ยงที่บดแล้วหมักในตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 10.0 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน กรองนำส่วนสารละลายออก เหยยตัวทำละลายเฮกเซนโดยเทคนิคการลดความดัน ได้สารสกัดชั้นเฮกเซนหนัก 10.5 กรัม นำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) และคลุกกับซิลิกาเจลจำนวน 50.0 กรัม บรรจุซิลิกาเจลที่ผสมตัวทำละลายเฮกเซนอิมัลชันในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 มิลลิเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร และอัดให้อุณหภูมิอากาศซิลิกาแน่น เทซิลิกาเจลที่คลุกสารสกัดหยาบเฮกเซนลงบนซิลิกาเจลที่อิมัลชันด้วยเฮกเซน และเพิ่มความมีขี้ของตัวทำละลายโดยเริ่มจาก 10-100% EtOAc/Hexanes ใช้เทคนิค TLC ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเพื่อรวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกัน ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 14 ส่วนสกัดย่อย (Fr.1-14) เลือกส่วนสกัดย่อยที่ Fr.2 (2.0 กรัม) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีและเพิ่มความมีขี้ของตัวทำละลายโดยเริ่มจาก 10-30% EtOAc/Hexanes ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 11 ส่วนสกัดย่อย (Fr.2.1-2.11) ส่วนสกัดย่อยที่ Fr.2.6 หนัก 110 มิลลิกรัม เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวชะคือ CH_2Cl_2 /Hexanes/MeOH (79.9:20:0.1) พบสารบริสุทธิ์จำนวน 1 ชนิดคือ Dulcisxanthone F (6) หนัก 2 มิลลิกรัม ส่วนสกัดย่อยที่ Fr.2.7 ตกผลึกในสารละลาย เมื่อกรองและทำให้แห้งพบว่าเป็นสาร Cochinchinone A (2) หนัก 140 มิลลิกรัม นำสารสกัดส่วนสกัดย่อยที่ Fr.2.7 ที่หนัก 850 มิลลิกรัม ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวชะ CH_2Cl_2 /Hexanes/MeOH (79.9:20:0.1) สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ β -mangostin (5) และ 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (3) หนัก 110 มิลลิกรัม และ 120 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในส่วนสกัดย่อยที่ Fr.3 สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิดคือ 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isoprenylxanthone (1) จำนวน 55 มิลลิกรัม โดยนำส่วนสกัดย่อย Fr.3 จำนวน 550 มิลลิกรัม แยกสารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีและเพิ่มความมีขี้ของตัวทำละลายโดยเริ่มจาก 10-20 % Acetone/Hexanes ส่วนสกัดย่อยที่ Fr.5 ตกผลึกในสารละลายเมื่อกรองและทำให้แห้งพบว่าเป็นสาร Dulcisxanthone B (4) หนัก 45 มิลลิกรัม สำหรับส่วนสกัดย่อยอื่นๆ ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณที่น้อย สารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้างทั้งหมดโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) 400 MHz Bruker Avance 400 สารบริสุทธิ์ 1-3 และ 5-6 ละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl_3 สำหรับ 4 ละลายโดยใช้ $\text{DMSO}-d_6$ สารบริสุทธิ์ทั้งหมดพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ^1H NMR (Proton nuclear magnetic resonance), ^{13}C NMR (Carbon-13 nuclear magnetic resonance), COSY (^1H - ^1H correlation spectroscopy), HSQC (^1H - ^{13}C Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy) และ HMBC (^1H - ^{13}C Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)

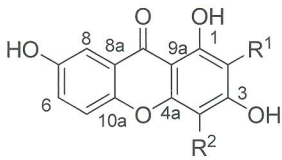
2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทดสอบที่ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สารบริสุทธิ์ทั้งหมดจะทดสอบกับเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้งหมด 5 ชนิดดังนี้ มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-620) มะเร็งปอด (ChaGo-K-1) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และมะเร็งเต้านม (BT-474) เลี้ยงเซลล์มะเร็งในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 5% FCS ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มี 5% CO₂ และความชื้น จนได้เซลล์ที่เจริญอยู่ในช่วง log phase ทำการ trypsinization ด้วย 0.05% trypsin-EDTA เตรียมเซลล์ที่ต้องการทดสอบลงในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture plate) ชนิด 96 หลุม หลุมละ 5 x 10³ เซลล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เลี้ยงเซลล์ในอาหาร RPMI-1640 ที่ผสมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) เลี้ยงเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง เติมสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวเกลี้ยงที่ละลายในตัวทำละลาย DMSO โดยเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO เติมสารปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ doxorubicin เตรียมที่ความเข้มข้นเดียวกับสารตัวอย่างแต่ละละลายใน NSS (Normal saline sterile) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ นาน 72 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุมเป็น DMSO ที่ไม่มีสารบริสุทธิ์จากตัวเกลี้ยง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง เติม MTT (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ดูค่าการเลี้ยงเซลล์ออก เติม DMSO ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร เขย่าจานเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร วัดกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ที่นำมาใช้ทดสอบ หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% เมื่อเทียบกับตัวควบคุม รายงานผลเป็นค่า IC₅₀ ในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [12-13] คำนวณร้อยละการยู่รอดของเซลล์มะเร็งได้ดังนี้

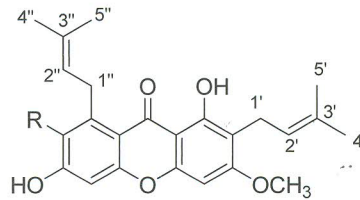
$$\text{ร้อยละการรอดของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของตัวควบคุม}} \times 100$$

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

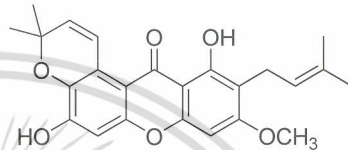
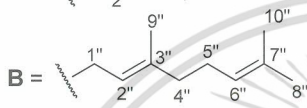
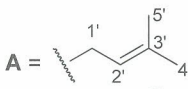
จากการแยกสารสกัดหยาบส่วนสกัดเอทเธนของกิ่งตัวเกลี้ยงจำนวน 1.5 กิโลกรัม โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 6 ชนิดคือ 1,3,7-trihydroxy-2,4-diisopropylxanthone (1), Cochinchinone A (2), 7-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (3), Dulcixanthone B (4), β-mangostin (5) และ Dulcixanthone F (6) โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1-6 แสดงในรูปที่ 1



	R ¹	R ²
1	A	A
2	A	B
3	B	A



4 R = OH
5 R = OCH₃



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งตัวเกลี้ยง

สารบริสุทธิ์ 1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง สามารถแยกได้จากส่วนสกัดย่อยที่ 3 โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และใช้ระบบตัวทำละลายคือ 10-20% Acetone:Hexanes ซึ่งสามารถแยกได้น้ำหนัก 55 มิลลิกรัม จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR และใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลาย พบสัญญาณของโปรตอน (δ_c) ที่สำคัญคือ สัญญาณของ OH proton 1 สัญญาณที่บริเวณ 13.00 (1H, s) บ่งชี้ว่า 1 มีหมู่ OH ที่ต่อกับวง aromatic ที่เป็นลักษณะการเกิด hydrogen bonding กับ carbonyl group สัญญาณ aromatic proton ที่ 7.62 (1H, d, $J = 2.2$ Hz) และ 7.26 (2H, m) บ่งชี้ว่าสาร 1 มี aromatic proton 3 สัญญาณ สัญญาณโปรตอนที่ 5.30 (2H, m), 3.53 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 3.47 (1H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.91 (3H, s), 1.88 (3H, s), และ 1.80 (3H, s), และ 1.77 (3H, s) ระบุว่า 1 มีหมู่ isoprenyl ทั้งหมด 2 หมู่ ต่อกับวง aromatic และจากข้อมูล ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC พบว่าหมู่ isoprenyl ทั้งสองต่อกับวง aromatic ที่ตำแหน่ง 2 และ 4 จากสัญญาณ carbon NMR (δ_c) พบสาร 1 มีคาร์บอนทั้งหมด 23 สัญญาณ จากข้อมูล NMR เบื้องต้นทำให้ทราบว่าสาร 1 เป็นสารกลุ่ม xanthone จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยอาศัยข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปี และจากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสาร 1 มีชื่อว่า 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isoprenylxanthone ซึ่งเคยมีรายงานการวิจัยจาก *C. cochinchinense* [4] ข้อมูล ¹H และ ¹³C NMR ของ 1 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

สารบริสุทธิ์ 2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากการตกผลึกส่วนสกัดย่อยที่ 2.6 ซึ่งสามารถแยกได้น้ำหนัก 140 มิลลิกรัม จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR และใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลาย ลักษณะ ¹H NMR ของ 2 มีความคล้ายคลึงกับ 1 แตกต่างกันที่สัญญาณ ¹H NMR ของหมู่ geranyl ที่ 5.30 (1H, m), 5.07 (1H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.58 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.07-2.13 (2H, m), 1.91 (2H, m), 1.87 (3H, s), 1.66 (3H, s), และ 1.59 (3H, s) และจากข้อมูลของ ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC ระบุว่า 1 มีหมู่ geranyl ต่อกับวง aromatic ที่ตำแหน่งที่ 4 แทนหมู่ isoprenyl ของ 1 จากสัญญาณ carbon NMR (δ_c) พบสาร 2 มีคาร์บอนทั้งหมด 28 สัญญาณ จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยอาศัยข้อมูลทาง สเปกโทรส

โกปี พบว่าสาร 2 มีชื่อว่า Cochinchinone A ซึ่งเคยมีรายงานการวิจัยจาก *C. cochinchinense* [14] ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ 2 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

สารบริสุทธิ์ 3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง สามารถแยกได้จากส่วนสกัดย่อยที่ 2.7 โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ CH_2Cl_2 :Hexanes:MeOH (79.9:20:0.1) ซึ่งสามารถแยกได้น้ำหนัก 110 มิลลิกรัม จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR และใช้ CDCl_3 พบว่าสัญญาณ ^1H NMR ของ 3 มีลักษณะที่คล้ายกับ 2 ต่างกันตรงที่สัญญาณ aromatic มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยที่ 7.63 (1H, d, $J = 2.8$ Hz) และ 7.26 (2H, m) ของสารบริสุทธิ์ 3 และ 7.64 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), และ 7.28 (1H, m) ของสารบริสุทธิ์ 2 จากข้อมูลของ ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC พบว่าหมู่ geranyl ของสารบริสุทธิ์ 3 ต่อยู่บนวง aromatic ที่ตำแหน่งที่ 2 แทนที่ตำแหน่งที่ 4 ของสารบริสุทธิ์ 2 จากสัญญาณ carbon NMR (δ) พบสาร 3 มีคาร์บอนทั้งหมด 28 ตัว จากข้อมูล NMR เบื้องต้นทำให้ทราบว่าสาร 3 มีชื่อว่า 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone ซึ่งเคยมีรายงานการวิจัยจาก *C. cochinchinense* [15] ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ 3 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1. ^1H NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งของตัวเกลี้ยง (400 MHz, δ in ppm, J in Hz)

ตำแหน่งที่	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^b	5 ^a	6 ^a
4				6.58 s	6.35 s	6.38 s
5	7.26 m	7.38 d	7.26 m	6.79 s	6.85 s	6.85 s
6	7.26 m	7.28 m	7.26 m			
8	7.62 d (2.2)	7.64 d	7.63 d			
1'	3.47 d (6.9)	3.49 d	3.56 d	3.23 d	3.37 d	3.38 d (7.3)
2'	5.30 m	5.30 m	5.30 m	5.14 t (6.7)	5.27 m	5.25 t (7.2)
4'	1.80 s	1.87 s	1.79 s	1.62 s	1.82 s	1.70 s
5'	1.88 s	1.79 s	1.90 s	1.73 s	1.71 s	1.82 s
1''	3.53 d (7.4)	3.58 t (7.4)	3.47 d	4.04 d	4.11 d	8.07 d (10.2)
2''	5.30 m	5.30 m	5.30 m	5.19 t (6.6)	5.27 m	5.85 d (10.2)
4''	1.77 s	1.91 m	2.10 m	1.73 s	1.85 s	1.52 s
5''	1.91 s	2.07-2.13	2.10 m	1.78 s	1.70 s	1.52 s
6''		5.07 t (6.6)	5.07 t (6.0)			
8''		1.59 s	1.60 s			
9''		1.87 s	1.87 s			
10''		1.66 s	1.66 s			
1-OH	13.00 s	13.12 s	13.01 s	13.78 s	13.44 s	13.36 s
3-OMe				3.89 s	3.92 s	3.93 s
7-OMe					3.83 s	

^a recorded in CDCl_3 , ^b recorded in $\text{DMSO}-d_6$

สารบริสุทธิ์ 4 สามารถตกผลึกได้จากส่วนสกัดย่อยที่ 5 ซึ่งสามารถตกผลึกได้น้ำหนัก 45 มิลลิกรัม จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR และใช้ DMSO- d_6 เป็นตัวทำละลาย พบสัญญาณของโปรตอน (δ_H) ที่สำคัญคือ สัญญาณของ OH proton 1 สัญญาณที่บริเวณ 13.78 (1H, s) บ่งชี้ว่า 4 มีหมู่ OH ที่ต่อกับวง aromatic ที่เป็นลักษณะการเกิด hydrogen bonding กับ carbonyl group สัญญาณ aromatic proton ที่ 6.79 (1H, s) และ 6.58 (1H, s) บ่งชี้ว่าสาร 4 มี aromatic proton 2 ตัว สัญญาณโปรตอนที่ 5.14 (1H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.23 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.73 (3H, s) และ 1.62 (3H, s) ระบุว่า มีหมู่ isoprenyl หมู่ที่ 1 ต่อกับวง aromatic และจากข้อมูลของ 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC พบว่าหมู่ isoprenyl ต่อกับวง aromatic ที่ตำแหน่งที่ 2 สัญญาณโปรตอนที่ 5.19 (1H, t, $J = 6.6$ Hz), 4.04 (2H, d, $J = 6.5$ Hz), 1.78 (3H, s), และ 1.73 (3H, s) ระบุว่า มีหมู่ isoprenyl หมู่ที่ 2 ต่อกับวง aromatic และจากข้อมูลของ 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC พบว่าหมู่ isoprenyl ต่อกับวง aromatic ที่ตำแหน่งที่ 8 สัญญาณ methoxy group ที่ต่อกับวง aromatic ที่ 3.89 (3H, s) จากสัญญาณ carbon NMR (δ_C) พบสาร 4 มีคาร์บอนทั้งหมด 24 สัญญาณ จากข้อมูล NMR ทำให้ทราบว่าสาร 4 มีชื่อว่า Dulcisxanthone B ซึ่งเคยมีรายงานการวิจัยจาก *Garcinia dulcis* [16] ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ของ 4 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 2. ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งของตัวเกลี้ยง (400 MHz, δ in ppm)

ตำแหน่งที่	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^b	5 ^a	6 ^a
1	158.2	158.4	158.2	158.7	159.8	159.2
2	108.9	109.2	105.0	112.4	111.5	111.5
3	161.0	161.0	161.1	162.9	163.5	162.8
4	105.2	105.1	109.1	89.2	88.8	88.7
4a	153.0	151.9	153.0	154.7	155.7	154.9
5	118.9	119.0	118.9	100.0	101.5	102.1
6	123.8	121.5	121.6	152.0	155.2	155.0.7
7	152.3	150.6	152.3	141.0	142.6	136.8
8	108.9	109.1	108.9	123.6	137.0	119.6
8a	120.5	120.3	120.5	109.9	112.4	108.4
9	180.9	180.9	180.9	181.6	181.9	182.6
9a	103.2	103.3	103.2	102.5	103.3	102.4
10a	150.4	150.6	150.4	152.7	154.5	152.9
1'	21.8	21.9	21.8	20.9	21.4	21.2
2'	121.7	121.6	121.6	122.2	122.3	122.1
3'	135.4	137.8	134.9	130.6	131.6	131.2
4'	25.8	17.9	25.8	25.3	17.8	25.6
5'	17.9	25.8	17.9	18.0	18.1	17.6
1''	21.8	21.6	21.6	25.4	26.5	121.1
2''	121.6	121.8	123.8	122.2	123.2	131.5

ตารางที่ 2. (ต่อ) ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งของตัวเกลี้ยง (400 MHz, δ in ppm)

ตำแหน่งที่	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^b	5 ^a	6 ^a
3''	133.9	135.0	137.9	130.1	132.0	71.2
4''	25.8	39.7	39.7	25.6	18.2	27.5
5''	17.9	26.4	26.4	17.6	25.8	26.9
6''		123.8	124.0			
7''		135.0	131.8			
8''		17.7	17.7			
9''		16.3	16.3			
10''		25.7	25.6			
3-Ome				56.1	55.8	55.7
7-Ome					62.0	

^a recorded in CDCl_3 , ^b recorded in $\text{DMSO}-d_6$

สารบริสุทธิ์ 5 สามารถแยกได้จากส่วนสกัดย่อยที่ 2.7 สามารถแยกได้น้ำหนัก 110 มิลลิกรัมจากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR และใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย พบสัญญาณของโปรตอน (δ_H) ที่สำคัญคือ สัญญาณของ OH proton 1 สัญญาณที่บริเวณ 13.44 (1H, s) บ่งชี้ว่า 5 มีหมู่ OH ที่ต่อกับวง aromatic ที่เป็นลักษณะการเกิด hydrogen bonding กับ carbonyl group สัญญาณ aromatic proton ที่ 6.85 (1H, s) และ 6.35 (1H, s) บ่งชี้ว่าสาร 5 มี aromatic proton 2 สัญญาณ สัญญาณโปรตอนที่ 5.27 (1H, m), 3.37 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.82 (3H, s), และ 1.71 (3H, s) ระบุว่าหมู่ isoprenyl หมู่ที่ 1 ต่อกับวง aromatic สัญญาณโปรตอนที่ 5.27 (1H, m), 4.11 (1H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.85 (3H, s), และ 1.70 (3H, s) ระบุว่าหมู่ isoprenyl หมู่ที่ 2 ต่อกับวง aromatic และจากข้อมูล ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC พบว่าหมู่ isoprenyl ต่อกับตำแหน่งที่ 2 และ 8 สัญญาณ methoxy group ที่ต่อกับวง aromatic ที่ 3.92 (3H, s) และ 3.83 (3H, s) จากสัญญาณ carbon NMR (δ_C) พบสาร 5 มีคาร์บอนทั้งหมด 25 สัญญาณ จากข้อมูล NMR ทำให้ทราบว่าสารบริสุทธิ์ 5 มีชื่อว่า β -mangostin ซึ่งเคยมีรายงานการวิจัยจาก *Garcinia cowa* [17] ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ 5 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

สารบริสุทธิ์ 6 สามารถแยกได้จากส่วนสกัดย่อยที่ 2.6 สามารถแยกได้ทั้งหมด 2 มิลลิกรัมจากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR และใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย พบสัญญาณของโปรตอน (δ_H) ที่สำคัญคือ สัญญาณของ OH proton 1 สัญญาณที่บริเวณ 13.36 (1H, s) บ่งชี้ว่า 6 มีหมู่ OH ที่ต่อกับวง aromatic ที่เป็นลักษณะการเกิด hydrogen bonding กับ carbonyl group สัญญาณ aromatic proton ที่ 6.85 (1H, s) และ 6.38 (1H, s) บ่งชี้ว่าสาร 6 มี aromatic proton 2 ตัว สัญญาณ doublet proton ที่ 8.07 (1H, d, $J = 10.2$ Hz) และ 5.85 (1H, d, $J = 10.2$ Hz) แสดงให้เห็นถึง conjugated unsaturated proton สัญญาณโปรตอนที่ 5.25 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 3.38 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.82 (3H, s), และ 1.70 (3H, s) ระบุว่าหมู่ isoprenyl ต่อกับวง aromatic จากข้อมูล ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC พบว่าหมู่ isoprenyl ต่อกับตำแหน่งที่ 2 หมู่ methyl 2 หมู่ จากสัญญาณโปรตอน 1.52 (6H, s) และสัญญาณ methoxy group ที่ 3.93 (3H, s) จากข้อมูล NMR ข้างต้นจะเห็นว่าโครงสร้างของสาร

บริสุทธ์ 6 มีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธ์ 4 ต่างกันที่สัญญาณของหมู่ isoprenyl ของ 6 ที่ตำแหน่งที่ 8 มีลักษณะแตกต่างไปจาก 4 จากการวิเคราะห์ข้อมูล ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC พบว่า 6 มีการปิดวงระหว่างออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ 7 และหมู่ isoprenyl ที่ตำแหน่งที่ 3' สัญญาณ carbon NMR (δ_c) พบสารบริสุทธ์ 6 มีคาร์บอนทั้งหมด 24 สัญญาณ จากข้อมูล NMR และการสืบค้นข้อมูลทำให้ทราบว่าสารบริสุทธ์ 6 มีชื่อว่า Dulcisxanthone F ซึ่งเคยมีรายงานการวิจัยจาก *C. cochinchinense* [14] ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ 6 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธ์ทั้งหมดทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดคือ มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-620) มะเร็งปอด (ChaGo-K-1) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และ มะเร็งเต้านม (BT-474) วิเคราะห์ประสิทธิภาพของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยใช้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดจากกิ่งตัวเกลี้ยงที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 50% (IC_{50}) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 3 ผลการทดสอบพบว่าสารบริสุทธ์จากกิ่งของตัวเกลี้ยง (1-6) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับดีมาก [18] อย่างไรก็ตามความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธ์จากตัวเกลี้ยงสามารถพิจารณาจากโครงสร้างที่มีความแตกต่างกัน โดยโครงสร้างหลักที่เหมือนกันแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือสารบริสุทธ์ 1-3 ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 และ 4 เป็น isoprenyl และ geranyl ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่าสาร 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ดีที่สุดโดยเฉพาะกับเซลล์มะเร็งปอด (ChaGo-K-1) ที่ระดับค่า IC_{50} 0.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ น้อยกว่า doxorubicin ที่ระดับ IC_{50} 0.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในขณะที่สาร 2 และ 3 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งน้อยกว่าสาร 1 หากพิจารณาโครงสร้างของสาร 1-3 จะพบว่าสาร 1 มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 2 และ 4 เป็นหมู่ isoprenyl แต่ในขณะที่สาร 2 และ 3 มีหมู่แทนที่เป็น isoprenyl และ geranyl อย่างละหนึ่งหมู่ แสดงให้เห็นว่าสารแซนโทนที่มีความมีขี้จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้มากกว่าโมเลกุลที่ไม่มีขี้เช่นเดียวกับสาร 4-6 หากพิจารณาโครงสร้างสาร 4 และ 5 จะมีความแตกต่างที่หมู่ methoxy ที่ตำแหน่งที่ 7 เมื่อมีหมู่ methoxy เพิ่มขึ้น จะทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลดลงโดยที่สารบริสุทธ์ 4 จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่มากกว่าสาร 5 สำหรับสาร 6 มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสาร 4 ต่างกันตรงที่สาร 6 มีการปิดวงของหมู่ isoprenyl

ตารางที่ 3. ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดจากกิ่งตัวเกลี้ยงที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 50% (IC_{50})

สาร	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	BT-474	ChaGo-K-1	HepG2	KATO-III	SW-620
1	1.05 \pm 0.44	0.46 \pm 0.05	0.46 \pm 0.22	0.63 \pm 0.41	3.11 \pm 1.10
2	5.09 \pm 0.89	0.64 \pm 0.50	0.43 \pm 0.11	3.92 \pm 0.76	4.61 \pm 0.27
3	5.99 \pm 0.57	0.64 \pm 0.25	0.60 \pm 0.18	0.87 \pm 0.36	4.04 \pm 0.32
4	3.47 \pm 1.07	0.67 \pm 0.44	5.00 \pm 1.13	2.47 \pm 1.08	3.62 \pm 0.47
5	8.97 \pm 1.48	7.21 \pm 2.93	7.20 \pm 0.48	7.38 \pm 0.66	5.99 \pm 0.93
6	6.17 \pm 0.69	0.62 \pm 0.25	0.60 \pm 0.29	1.00 \pm 0.58	4.36 \pm 0.46
doxorubicin	0.63 \pm 0.29	0.68 \pm 0.11	0.09 \pm 0.05	0.92 \pm 0.46	0.10 \pm 0.03

4. สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากกิ่งของตัวเกลี้ยง ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-isopropylxanthone (1), Cochinchinone A (2), 7-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (3), Dulcisxanthone B (4), β -mangostin (5) และ Dulcisxanthone F (6) สารบริสุทธิ์ทั้งหมดวิเคราะห์โครงสร้างโดยเทคนิค NMR (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) และเปรียบเทียบข้อมูลทางด้านสเปกโทรสโกปีจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สารบริสุทธิ์ทั้งหมดเป็นสารกลุ่มแซนโทนที่มีความหลากหลายทางด้านหมู่แทนที่ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดคือ ชนิดคือ มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-620) มะเร็งปอด (ChaGo-K-1) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และมะเร็งเต้านม (BT-474) จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่า สารกลุ่มแซนโทนที่แยกได้จากตัวเกลี้ยงมีความหลากหลายทั้งทางด้านโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาการคิดค้นยารักษาโรคมะเร็งต่อไป อาจปรับปรุงโครงสร้างโดยกระบวนการทางเคมีสังเคราะห์เพื่อให้ได้มีหมู่แทนที่ ที่หลากหลายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2557 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ รหัสโครงการ A84/2557 ขอขอบคุณคุณบุญส่ง ดิษมังคล้อ คุณณรงค์ศักดิ์ ขุนรักษา สำหรับการเตรียมตัวอย่าง NMR

เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] สำนักสำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชกรม อุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2552. ป่าเต็งรังแม่น้ำภาชี. พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. [Office of the forest herbarium, department of national parks, wildlife and plant conservation, 2009. Dipterocarp forest of Chi river. 1st ed. Office of the forest herbarium, wildlife and plant conservation. Bangkok (in Thai)]
- [2] Duan, Y., Dai, Y., Chen, L., Liu, M., Li, Y. and Yao, X. 2012. Xanthones from the stems of *Cratoxylum cochinchinense*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50(9), 642-645.
- [3] Udomchotphruet, S., Phuwapraisirisan, P., Sichaem, J. and Tip-Pyang, S. 2012. Xanthones from the stems of *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry*, 73, 148-151.
- [4] Ren, Y., Matthew, S., Lantvit, D.D., Ninh, T.N., Chai, H., Fuchs, J.R., Soejarto, D.D., De Blanco, E.J.C., Swanson, S.M. and Kinghorn, A.D. 2011. Cytotoxic and NF- κ B inhibitory constituents of the stems of *Cratoxylum cochinchinense* and their semisynthetic analogues. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1117-1125.

- [5] Nguyen, H.D., Trinh, B.T.D., Nguyen, N.K., Dang, S.V., Pham, H.D. and Nguyen, L.H.D. 2011. Xanthonenes from the twigs of *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry Letters*, 4(1), 48-51.
- [6] Jin, S.L., Wang, N.L., Zhang, X., Dai, Y. and Yao, X.S. 2009. Two new xanthonenes from the stems of *Cratoxylum cochinchinense*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(4), 322-325.
- [7] Mahabusarakam, W., Rattanaburi, S., Phongpaichit, S. and Kanjana-Opas 2008. Antibacterial and cytotoxic xanthonenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry Letters*, 1(4), 211-214.
- [8] Rahimmalek, M., Mirzakhani, M. and Ghasemi P.A. 2013. Essential oil variation among 21 wild myrtle (*Myrtus communis* L.) populations collected from different geographical regions in Iran. *Industrial Crops and Products*, 51, 328-333.
- [9] Bajalan, I. and Ghasemi Pirbalouti, A. 2014. Variation in antibacterial activity and chemical compositions of essential oil from different populations of myrtle. *Industrial Crops and Products*, 61, 303-307.
- [10] Chen, F., Li, H.L., Tan, Y.F., Guan, W.W., Zhang, J.Q., Li, Y.H., Zhao, Y.S. and Qin, Z.M. 2014. Different accumulation profiles of multiple components between pericarp and seed of *Alpinia oxyphylla* capsular fruit as determined by UPLC-MS/MS. *Molecules*, 19(4), 4510-4523.
- [11] Kennedy, D.O. and Wightman, E.L. 2011. Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2, 32-50.
- [12] Twentyman, P.R. and Luscombe, M.A. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56, 279-285.
- [13] Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47, 936-942.
- [14] Mahabusarakam, W., Nuangnaowarat, W. and Taylor, W.C. 2006. Xanthone derivatives from *Cratoxylum cochinchinense* roots. *Phytochemistry*, 67, 470-474.
- [15] Bennett, G.J., Harrison, L.J., Dia, G.L. and Sim, K.Y. 1993. Triterpenoids, tocotrienols and xanthonenes from the bark of *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry*, 32(5), 1245-1251.
- [16] Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S. and Taylor, W.C. 2005. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, 66, 2368-2375.

- [17] Likhitwitayawuid, K., Phadungcharoen, T. and Krungkrai, J. 1998. Antimalarial Xanthones from *Garcinia cowa*. *Planta Medica*, 64, 70-72.
- [18] Srisawat, T., Chumkaew, P., Heed-Chim, W., Sukpondma, Y. and Kanokwiroon, K. 2013. Phytochemical screening and cytotoxicity of crude extracts of *Vatica diospyroides* Symington type LS. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 71-76.

