



รายงานการวิจัย
เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง
**CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
THE AERIAL PART OF *EUPHORBIA HETEROPHYLLA* LINN.**

มนนภา เทพสุด

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยศรีปทุม
ปีการศึกษา 2560

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ ศาสตราจารย์ ดร.สมยศ สุทธิไวยกิจ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ท่านที่ปรึกษารายงานวิจัยที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ รวมถึงให้การสนับสนุนการใช้สถานที่ห้องปฏิบัติการเคมี เครื่องมือการวิเคราะห์ทางสเปกโทรสโกปี อุปกรณ์บางชนิด และสารเคมีบางส่วนในตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัย จนทำให้รายงานการวิจัยนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอแสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมาไว้ ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.รัชนิพร พุกยาภรณ์ พุกกะมาน อธิการบดี มหาวิทยาลัยศรีปทุม ที่ได้อนุมัติทุนการวิจัย รวมทั้งขอขอบพระคุณประธาน และคณะกรรมการพัฒนางานวิจัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและประสานงานในด้านต่างๆ ของการดำเนินงานวิจัย รวมถึงศาสตราจารย์ ดร.สมเดช กนกเมธากุล อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์การทำ ECD Experiment ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ และดร.จันทนา ยะหัวฝ่าย นักวิจัยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด ดร.ชลธิชา สีกา (ผู้ช่วยวิจัย) นายสุริพล สิงหา และ นส.สุดารัตน์ เครือแก้ว (นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาเคมีประยุกต์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง) ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ทั้งนี้ ประโยชน์ใดๆ ที่เกิดจากรายงานการวิจัยเล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบความดีนี้แด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ให้ความสำคัญและช่วยเหลือให้การทำงานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้ในที่สุด

มนนภา เทพสุด

ผู้วิจัย

เมษายน 2565

หัวข้อวิจัย : องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง
ผู้วิจัย : นางมนนภา เทพสุด
หน่วยงาน : สำนักวิชาศึกษาทั่วไป มหาวิทยาลัยศรีปทุม
ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2565

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง และศึกษาหาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัด โดยวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนและสารสกัดชั้นเมทานอลของส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cells) ระดับปานกลาง และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) ระดับต่ำ โดยที่สารสกัดชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HelaS3 cells) ระดับปานกลางด้วย และการแยกสารบริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน และสารสกัดชั้นเมทานอลของส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง สามารถแยกสารที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีที่ไม่เคยมีรายงานในกลุ่ม megastigmane ได้ 3 ชนิด คือ (3*R*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 5**), (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol (**EH 7**) และ (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 8**) และสารที่มีรายงานมาแล้ว 12 ชนิด โดยเป็นสารกลุ่ม megastigmane 5 ชนิด คือ blumenol A (หรือ vomifoliol) (**EH 1**), (6*S*)-dehydrovomifoliol (**EH 2**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (**EH 3**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 4**) และ (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-ene-9-oxo-megastigmane (**EH 6**) สารกลุ่ม diterpene 2 ชนิด คือ *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol (**EH 9**) และ 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol (**EH 10**) สารกลุ่ม triterpene 2 ชนิด คือ glut-5-en-3 β -ol (**EH 11**) และ lupeol acetate (**EH 15**) สารกลุ่ม sterol 3 ชนิด คือ stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol (**EH 12**), β -sitosterol (**EH 13**) และ β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucoside (**EH 14**) โดยสารทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ **EH 1**, **EH 2**, **EH 3**, **EH 4**, **EH 6**, **EH 9**, **EH 10**, **EH 11** และ **EH 12** เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก และมะเร็งปากมดลูก พบว่ามีเฉพาะสารประกอบ **EH 11** ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งระดับปานกลาง

คำสำคัญ : หญ้ายาง องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ

Research Title : Chemical Constituents and Biological Activities of
the Aerial Part of *Euphorbia heterophylla* Linn.
Name of Researcher : Mrs. Monnapa Thapsut
Name of Institution : Institute of General Education, Sripatum University
Year of Publication : B.E. 2565

ABSTRACT

The aims of this research is to analyze the chemical constituents of extracts from the aerial part of *Euphorbia heterophylla* Linn. and to study for biological activities of the extracts. Structure identification of pure substances was based on spectroscopic data.

From this study, it was found that the dichloromethane and methanol extracts were moderate cytotoxic against KB but less toxic to Vero cell lines. In addition the methanol extract showed moderate cytotoxic activity against HeLaS3 cell lines . The chromatographic separation of the dichloromethane and methanol extracts of the aerial part of *E. heterophylla* led to the isolation of three new megastigmanes comprising (3*R*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 5**), (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol (**EH 7**) and (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 8**) together with twelve known compounds including 5 megastigmanes which were identified as blumenol A (or vomifoliol) (**EH 1**), (6*S*)-dehydrovomifoliol (**EH 2**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (**EH 3**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 4**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-ene-9-oxo-megastigmane (**EH 6**), 2 diterpenes, named *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol (**EH 9**) and 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol (**EH 10**) two triterpenes, named glut-5-en-3 β -ol (**EH 11**) and lupeol acetate (**EH 15**) and three sterol, stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol (**EH 12**), β -sitosterol (**EH 13**) and β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucoside (**EH 14**). Nine compounds (**EH 1**, **EH 2**, **EH 3**, **EH 4**, **EH 6**, **EH 9**, **EH 10**, **EH 11** and **EH 12**) were evaluated for their cytotoxic activity against KB and HeLaS3 cell lines, only compound **EH 11** exhibited moderate activity.

Keywords : *Euphorbia heterophylla* Linn., Chemical Constituents, Biological Activities

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ.....	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
	1.3 คำถามการวิจัย.....	2
	1.4 สมมุติฐานการวิจัย.....	2
	1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
	1.6 ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	3
	1.7 นิยามศัพท์.....	3
	1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2	วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
	2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพืชสมุนไพร.....	5
	2.2 ทฤษฎีเกี่ยวกับการหาสารสำคัญในพืชสมุนไพร.....	9
	2.3 ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
	2.4 สรุป.....	20
3	ระเบียบวิธีการวิจัย.....	21
	3.1 รูปแบบการวิจัย.....	21
	3.2 ตัวอย่าง.....	21
	3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	22
	3.4 เครื่องมือการวิจัย.....	23
	3.5 สถานที่ทำการวิจัย.....	24
	3.6 การรวบรวมข้อมูล.....	24
	3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	24

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	25
	4.1 ผลการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง.....	25
	4.2 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 1.....	34
	4.3 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 2.....	38
	4.4 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 3.....	41
	4.5 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 4.....	45
	4.6 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 5.....	48
	4.7 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 6.....	51
	4.8 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 7.....	54
	4.9 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 8.....	58
	4.10 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 9.....	61
	4.11 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 10.....	64
	4.12 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 11.....	67
	4.13 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 12.....	70
	4.14 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 13.....	73
	4.15 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 14.....	75
	4.16 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 15.....	77
	4.17 การพิสูจน์โครงสร้างสเตอริโอเคมีด้วยเทคนิคทางเคมีคำนวณ.....	80
5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	81
	สรุปการดำเนินงานวิจัย.....	81
	สรุปผลการวิจัย.....	81
	อภิปรายผล.....	82
	ข้อเสนอแนะ.....	82
	บรรณานุกรม.....	83

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	90
¹ H และ <i>J</i> -modulated ¹³ C NMR Spectra ของสารประกอบ EH 1 - EH 15	91
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ blumenol A กับสารประกอบ EH 1 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 1	37
2	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ (+)-dehydrovomifoliol กับสารประกอบ EH 2 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 2	40
3	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol กับสารประกอบ EH 3 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 3	44
4	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside กับสารประกอบ EH 4 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 4	47
5	ค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 5	50
6	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>E</i>)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one กับสารประกอบ EH 6 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 6	53
7	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ drummondol กับสารประกอบ EH 7 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 7	57
8	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ spionoside B กับสารประกอบ EH 8 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 8	60
9	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ <i>ent</i> -kaurane-3 β ,16 β ,17-triol กับสารประกอบ EH 9 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 9	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol กับสารประกอบ EH 10 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 10	66
11	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ glut-5-en-3 β -ol กับสารประกอบ EH 11 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 11	69
12	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol กับสารประกอบ EH 12 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 12	72
13	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H -NMR ของสารประกอบ β -sitosterol กับสารประกอบ EH 13	74
14	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H -NMR ของสารประกอบ β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside กับสารประกอบ EH 14	76
15	เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ lupeol acetate กับสารประกอบ EH 15	79

สารบัญภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 พืชสมุนไพรหญ้ายาง.....	6
2 ลำต้นของต้นหญ้ายาง.....	7
3 ส่วนใบของต้นหญ้ายาง.....	8
4 ส่วนดอกและผลของต้นหญ้ายาง.....	8
5 แผนผังการสกัดแยกสารจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	25
6 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 11 และ EH 15 จากสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	26
7 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 1 , EH 2 และ EH 6 จากสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	27
8 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 9 จากสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	28
9 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 7 จากสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	29
10 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 3 จากสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	30
11 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 4 , EH 5 และ EH 8 จากสารสกัดชั้น MeOH ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	31
12 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 10 และ EH 14 จากสารสกัดชั้น MeOH ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	32
13 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 12 และ EH 13 จากสารสกัดชั้น MeOH ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง.....	33
14 ^1H - ^1H COSY Correlations ของสารประกอบ EH 1	35
15 การเปรียบเทียบ Experimental ECD กับ Calculated ECD ของสารประกอบ EH 1	36
16 ^1H - ^1H COSY Correlations ของสารประกอบ EH 3	43
17 การเปรียบเทียบ Experimental ECD กับ Calculated ECD ของสารประกอบ EH 3	43

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
18 การเปรียบเทียบ Experimental ECD กับ Calculated ECD ของสารประกอบ EH 7..	56
19 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 1	92
20 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 1	92
21 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 2	93
22 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 2	93
23 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 3	94
24 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 3	94
25 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 4	95
26 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 4	95
27 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 5	96
28 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 5	96
29 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 6	97
30 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 6	97
31 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 7	98
32 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 7	98
33 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 8	99
34 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 8	99
35 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 9	100
36 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 9	100
37 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 10	101
38 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 10	101
39 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 11	102
40 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 11	102
41 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 12	103
42 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 12	103

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
43	^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 13	104
44	^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 14	105
45	^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 15	106
46	J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 15	106

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แม้การรักษาโรคต่างๆ ในยุคปัจจุบัน จะมีการนำตัวยาสังเคราะห์มาใช้กันอย่างแพร่หลาย หากแต่วัตถุดิบที่ใช้ผลิตตัวยายังเกือบครึ่งหนึ่งล้วนมีแหล่งที่มาจากพืชสมุนไพร ทั้งที่อยู่ในสภาพสกัดเป็นสารบริสุทธิ์ สารผสม หรือสารกึ่งสังเคราะห์ที่ได้สารตั้งต้นมาจากพืชสมุนไพร เนื่องจากพืชสมุนไพรซึ่งมีสรรพคุณในการรักษาโรคนั้น มีสารสำคัญเป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ดังเช่น (1) ต้นบัวบก [*Centella asiatica* (Linn.) Urban] ซึ่งมีฤทธิ์สมานแผล และต้านการอักเสบ มีสารสำคัญของ asiaticoside, asiatic acid, madecassoside และ madecassic acid (Vogel, De Souza, and D'Sa, 1990) และ (2) ต้นทับทิม (*Punica granatum* Linn.) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านเชื้อมาลาเรีย และต้านอนุมูลอิสระ มีสารสำคัญของ ellagic acid, gallagic acid, punicalins และ punicalagins (Reddy et al., 2007)

ทั้งเป็นที่น่าสนใจว่า ประเทศไทยยังมีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดในกลุ่มวัชพืชที่ถูกละเลย หากแต่กลับมีสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจหลายอย่าง โดยเฉพาะวัชพืชในสกุล *Euphorbia* ดังเช่น (1) ต้นน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* Linn.) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย วัณโรค ไวรัส เชื้อรา และโปรโตซัว มีสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีน โพลีฟีนอล และแทนนิน (นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2541; Patil, Naikwade, and Magdum, 2009) (2) ต้นน้ำนมราชสีห์เล็ก (*Euphorbia thymifolia* Linn.) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านมาลาเรีย ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งเนื้องอก ยับยั้งเชื้อไวรัส ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฆ่าไรทะเล มีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก ไฮโดรไลซ์แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และสเตียรอยด์ (นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2541; Gupta, Srivastava, and Goyal, 2007) และ (3) ต้นเข้าค่า (*Euphorbia sessiliflora* Roxb.) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์พีน (Sutthivaiyakit, Thapsut, and Prachayasittikul, 2000)

จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะดำเนินงานวิจัยวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรไทยในสกุล *Euphorbia* โดยเฉพาะกับต้นหญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* Linn.) เหตุเพราะเป็นวัชพืชที่ยังมีการศึกษาวิจัยด้านองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มากนัก อีกทั้งมีแนวโน้มว่าน่าจะเป็นแหล่งสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเคยมีรายงานทางด้านสรรพคุณการรักษาโรค ทั้งการถูกนำมา

ใช้รักษาหิด ขับน้ำมัน แก้วพิษฝึภายในและภายนอก แก้วพิษงู แก้วพิษแมลง และแก้วโรคผิวหนังพุพอง (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2550) ทั้งนี้เพื่อที่จะนำผลงานวิจัยที่ได้มาตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ อันจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการที่ทำวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพร และต่อการนำไปใช้ป็นองค์ความรู้พื้นฐาน เพื่อพัฒนาตัวยารักษาโรคเป็นลำดับต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดวัตถุประสงค์สำคัญ ดังนี้

- 1.2.1 เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง
- 1.2.2 เพื่อศึกษาหาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัด จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง

1.3 คำถามการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดคำถามการวิจัยที่สำคัญ ดังนี้

- 1.3.1 สารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารชนิดใดบ้าง
- 1.3.2 สารสกัดในส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไร

1.4 สมมุติฐานการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดสมมุติฐานการวิจัย ดังนี้

- 1.4.1 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง น่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนหรือแตกต่างจากพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน
- 1.4.2 สารสกัดในส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง น่าจะมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาได้

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดขอบเขตการทำวิจัยที่สำคัญ ดังนี้

1.5.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง คือส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง เก็บจาก หมู่ 12 บ้านสะเดาพัฒนา ตำบลเทพรักษา อำเภอสังขะ จังหวัดสุรินทร์ น้ำหนักรวม (ใบและลำต้น) 12.4 กิโลกรัม

1.5.2 เนื้อหาของการวิจัย

- (1) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง
- (2) การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคขั้นสูงทางเคมี เช่น อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโตรเมตรี
- (3) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล

1.5.3 ระยะเวลา

ระยะเวลาดำเนินการวิจัยรวม 12 เดือน

1.6 ข้อจำกัดของการวิจัย

ในขั้นตอนการนำสารสกัดมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟี อาจได้สารปริมาณน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร ทำให้จำเป็นต้องแยกซ้ำเพื่อเพิ่มปริมาณสาร ส่งผลให้ต้องใช้ระยะเวลาดำเนินการวิจัยเพิ่มมากขึ้นได้

1.7 นิยามศัพท์

การวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดนิยามศัพท์ ดังนี้

พืชสมุนไพร (Herb) หมายถึง พืชที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ส่วนใดส่วนหนึ่งหรือหลายส่วน เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล ซึ่งอาจอยู่ในสภาพสมุนไพรสดหรือแห้งที่ยังไม่ได้แปรรูป ทั้งที่ใช้เป็นอาหาร เช่น ผักพื้นบ้าน อาหารสมุนไพรต่างๆ ใช้เป็นยา เช่น ใบมะขามแขกใช้ทานเป็นยาระบาย หรือใช้ประโยชน์อื่นๆ เช่น ผลมะกรูดใช้สระผม ตะไคร้หอมใช้ไล่ยุง เป็นต้น รวมทั้งเป็นพืชต่อมมนุษย์และสัตว์ด้วย

องค์ประกอบทางเคมี (Chemical Constituents) หมายถึง สารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ ที่ให้สรรพคุณในการรักษาตามข้อบ่งใช้ และ/หรือสารที่พบมากและสารอื่นๆ ในพืชสมุนไพร ซึ่งรวบรวมได้จากรายงานการวิจัย จากห้องปฏิบัติการทั้งในและต่างประเทศ โดยระบุกลุ่มของสารประกอบและชื่อของสารในแต่ละกลุ่ม

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) หมายถึง สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น และ

สารนั้นต้องไม่มีผลทางลบต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยามีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้น เชื้อโรค หรือ ส่วนเกิน (มะเร็ง) ที่ต้องการขจัดเท่านั้น สำหรับสารใดก็ตามถ้ามีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ สารนั้น จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสารพิษ (toxic substance)

สารสกัดหยาบ (Crude Extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นเป็น สารบริสุทธิ์ ซึ่งเตรียมได้โดยผ่านกรรมวิธีการสกัดที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ ได้โดยตรง หรือต้องผ่านกรรมวิธีการผลิตก่อนที่จะนำไปทำผลิตภัณฑ์

สารสำคัญในพืช (Phytochemical) หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืช ทำให้ พืชมีสี กลิ่น หรือสมบัติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว โดยพืชแต่ละชนิดจะมีสารสำคัญหลายชนิด

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยครั้งนี้เมื่อทำเสร็จสมบูรณ์ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับมีดังนี้

- 1.8.1 ทำให้สามารถทราบชนิดของสารบริสุทธิ์ ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง
- 1.8.2 ทำให้สามารถทราบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัด จากส่วนเหนือดิน ของต้นหญ้ายาง
- 1.8.3 ทำให้สามารถทราบชนิดของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ ที่จะนำไปใช้พัฒนาในด้านตัวยา รักษาโรคได้เป็นลำดับต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่อง “องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง” ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าตำรา และบทความเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับเรื่องที่วิจัย ทั้งในด้านความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเรื่องที่วิจัย ทฤษฎีที่รองรับเรื่องที่วิจัย และผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น และเป็นแนวทางในงานวิจัยโดยแบ่งเป็นประเด็นต่างๆ ดังนี้

- 2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพืชสมุนไพร
- 2.2 ทฤษฎีเกี่ยวกับการหาสารสำคัญในพืชสมุนไพร
- 2.3 ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 2.4 สรุป

2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพืชสมุนไพร

2.1.1 สารสำคัญในพืช

ความหลากหลายของพืชพรรณนานาชนิด ทั้งในด้านรูปพรรณสัณฐาน และสรรพคุณต่างๆ อันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของพืชแต่ละชนิดนั้น ล้วนมีผลมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีภายในพืชหรือที่เรียกว่า “สารพฤกษเคมี” ซึ่งพืชสร้างขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

(1) กลุ่มสารปฐมภูมิ พบในพืชชั้นสูงทั่วไป เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน กรดอะมิโน และเอ็นไซม์ ซึ่งพบได้ในพืชเกือบทุกชนิด

(2) กลุ่มสารทุติยภูมิ เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช ซึ่งพืชแต่ละชนิดต่างผลิตขึ้นมาเอง เพื่อเสริมสร้างสีสัน รสชาติ และกลิ่น ตลอดจนโครงสร้างเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ แอลคาลอยด์ สารกลุ่มฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ และกลัยโคไซด์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไชยานาเจนดิก กลัยโคไซด์ และสารกลุ่มกลูโคซิโนเลต เป็นต้น (วันดี ฤกษ์พันธ์, 2544)

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ได้แก่ น้ำตาล อนุพันธ์ของน้ำตาล โพลีแซคคาไรด์

สารกลุ่มไขมัน แบ่งได้เป็น ไขมันธรรมดา ไขมันประกอบ และอนุพันธ์ของลิพิด ไขมันธรรมดา ได้แก่ กลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ และไขมันประกอบ ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด ไกลโคลิพิด และไลโปโปรตีน สำหรับอนุพันธ์ของลิพิดที่สำคัญ ได้แก่ กรดไขมันชนิดอิ่มตัว และชนิดไม่อิ่มตัว

โปรตีน เป็นสารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนมาจับกัน ส่วนเอ็นไซม์เป็นคอลลอยด์ที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ

สารกลุ่มแอลคาลอยด์ เป็นกลุ่มสารที่พบในพืชชั้นสูงเป็นส่วนใหญ่ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นด่าง มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุล และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เด่นชัด สารกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ non-heterocyclic alkaloids ซึ่งมีไนโตรเจนอยู่นอกวงแหวน และกลุ่ม heterocyclic alkaloids ซึ่งมีไนโตรเจนอยู่ในวงแหวน

สารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ ฟีนอล กรดฟีนอลิก บาลซัม เบนโซอิน คูมารินส์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และสารควิโนน

สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ พบได้ทั้ง monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, และ tetraterpenes สำหรับ monoterpenes และ sesquiterpenes ส่วนใหญ่พบเป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืช

สารกลุ่มสเตอรอยด์ อาจพบในรูปที่มีหมู่ไฮดรอกซีอิสระ และในรูปไกลโคไซด์ เช่น คาร์ดิเอ็กไกลโคไซด์

สำหรับสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีคุณสมบัติประโยชน์ต่อมวลมนุษย์ทั้งในด้านการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ นั้นล้วนอยู่ในกลุ่มสารทุติยภูมิ ดังนั้นสารเคมีที่มีบทบาทสำคัญต่อการกำหนดสรรพคุณทางยาของพืชแต่ละชนิดจึงเป็นสารสำคัญในกลุ่มนี้นั่นเอง

2.1.2 หญ้าหาง

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ “หญ้าหาง” ซึ่งมีสรรพคุณเป็นทั้งผักและยามาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยคนส่วนใหญ่จะรู้จักกันในลักษณะที่เป็นวัชพืชมากกว่าสมุนไพร



ภาพประกอบ 1 พืชสมุนไพรหญ้าหาง

สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับต้นหญ้าที่มีดังนี้ (ดวงพร สุวรรณกุล และรังสิต สุวรรณเขตนิกม, 2545; เทวีรัตน์ ศรีทอง, 2548; ธวัชชัย รัตน์ชเลศ และเจมส์ เอฟ. แมกซ์เวล., 2540; ธัญชนก จงรักไทยศิริพร ซึ่งสนธิพร และกาญจนา พฤษพันธ์ 2556; เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2550; สุรชัย มัจฉาชีพ, 2544)

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name):

Euphorbia heterophylla Linn.

ชื่อสามัญภาษาไทย (Common name, Thai):

หญ้ายาง ผักยาง ใบต่างดอก เขยตาย ลูกเขยตายแม่ยายทำศพ

ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ (Common name, English):

Mexican fireplant, Painted spurge, Red milkweed, Wild poinsettia

ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic information):

วงศ์ (Family): Euphorbiaceae

สกุล (Genus): *Euphorbia*

ชนิด (Species): *Euphorbia heterophylla*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Botanical characteristics)

ต้น: เป็นพืชล้มลุก อายุฤดูเดียว ต้นพุ่มทรงโปร่ง ลำต้นตั้งตรงกลางและอ่อน สูงประมาณ 30-80 เซนติเมตร เปลือกลำต้นสีเขียว ผิวเรียบ มีขนปกคลุมโดยตลอด แตกกิ่งก้านสาขาไม่มาก ทุกส่วนของลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น



ภาพประกอบ 2 ลำต้นของต้นหญ้ายาง

ใบ: มีหลายรูปร่างตั้งแต่ยาวรีจนถึงกลม ปลายใบเรียวแหลม โคนใบเรียวสอบมีสีเขียวอ่อน ขอบใบเรียบ มีจักละเอียดแหลม หรืออาจหยักเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ ใบกว้าง 1-5 เซนติเมตร และยาว 5-8 เซนติเมตร แผ่นใบมีขนปกคลุมประปรายจนถึงไม่มีขนเลย ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียวเรียงเวียน

ออกจากลำต้นแบบสลับ ขกเว้น ใบคู่ล่างสุดกับคู่บนสุดที่ออกจากลำต้นในลักษณะตรงข้าม ส่วนก้านใบ มีสีม่วงแดงและมีขนขึ้นปกคลุม



ภาพประกอบ 3 ส่วนใบของต้นหญ้ายาง

ดอก: ดอกออกเป็นช่อกระจุกแน่นที่ปลายยอด กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็น 5 แฉก ไม่มีกลีบดอก มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียปะปนอยู่บนช่อเดียวกัน ซึ่งถูกรองรับด้วยแผ่นสีเขียว คล้ายใบหลายใบ ดอกย่อยตั้งอยู่บนก้านดอกสั้นๆ ดอกมีสีขาวอมเขียว



ภาพประกอบ 4 ส่วนดอกและผลของต้นหญ้ายาง

ผล: เป็นผลแบบแห้ง ทรงกลม ไม่มีขน ผลอ่อนสีเขียวอ่อน ผลแก่สีน้ำตาล ผลแก่จะแตก ออกเป็น 3 กลีบ แต่ละกลีบมี 1 เมล็ด เมล็ดมีสีน้ำตาลหรือดำ รูปร่างกลม-รี ขนาดกว้าง 1.8-2.0 มิลลิเมตร ยาว 1.8-2.5 มิลลิเมตร ผิวเมล็ดขรุขระเป็นร่องรอบเมล็ด 1-2 เส้น มีสันขรุขระ มีลักษณะเป็น ปลายแหลมอยู่ข้างหนึ่ง ทำให้เมล็ดคืบเบี้ยว ขยายพันธุ์โดยอาศัยเมล็ด

ราก: มีระบบรากแก้วแข็งแรงข้งลงไปดินลึก

ถิ่นที่อยู่ (Habitat):

เจริญเติบโตได้ในที่น้ำไม่ท่วมขัง เจริญงอกงามในที่ดินปนทราย เป็นวัชพืชในพื้นที่เพาะปลูกพืชผัก พืชไร่ และพืชสวนทั่วไป

การแพร่กระจาย (Distribution)

พบทั่วไปตามพื้นที่รกร้าง ริมทาง ทุ่งนา ที่โล่งแจ้ง และพื้นที่เพาะปลูกบางแห่ง เป็นพืชต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทยหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยพบครั้งแรกที่สถานีทดลองเกษตรกรรมศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย ประมาณปี พ.ศ. 2492-2493 และแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว จนกลายเป็นวัชพืชที่พบทั่วไปในทุกภาคของประเทศ

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological Activities)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) (Falodun, Okunrobo, and Uzoamaka, 2006) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) (Falodun, Agbakwuru, and Ukoh, 2003) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Okeniyi, Adedoyin, and Garba, 2013) ฤทธิ์ต้าน HIV (anti-HIV activity) (Williams et al., 1995) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer activity) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) (Sundaram et al., 2010) ฤทธิ์ต้านการจับตัวเป็นก้อนของเลือด (anticoagulant activity) (Unekwe, Ughachukwu, and Ogamba, 2006) และฤทธิ์ยับยั้งการเจ็บปวด (antinociceptive activity) (Vamsidhar et al., 2000)

สรรพคุณทางยา (Medicinal Properties)

เป็นยาระบาย (Erden et al., 1999) ขับน้ำนม แก้พิษงู แก้พิษแมลง รักษาบาดแผล รักษาฝีภายในและภายนอก และรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหลอดเลือดอักเสบ โรคผิวหนังพุพอง โรคหิด โรคหืด โรคหูด และโรคไฟลามทุ่ง (เพ็ญญา ทรัพย์เจริญ, 2550)

2.2 ทฤษฎีเกี่ยวกับการหาสารสำคัญในพืชสมุนไพร

หลักทั่วไปของการค้นหาสารสำคัญชนิดต่างๆ โดยเฉพาะที่เป็นสารพฤษเคมีในกลุ่มสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพร คือการสกัดและแยกหาสารสำคัญในพืช ส่วนใหญ่มักเริ่มต้นสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยมายังตัวทำละลายที่มีขั้วมาก เช่น เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) ตามลำดับ หรืออาจสกัดโดยใช้แอลกอฮอล์ (เมทานอลหรือเอทานอล) แล้วนำมาสกัดแยกส่วนกับตัวทำละลายตามลำดับของความมีขั้ว

โดยปกติแล้ว สังคมไทยนิยมใช้สมุนไพรในรูปแบบของยาต้มและยาดอง โดยใช้น้ำและแอลกอฮอล์เป็นตัวสกัด ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับรูปแบบการนำไปใช้ การสกัดแยกหาสารสำคัญ

จึงควรเป็นรูปแบบสกัดหาสารสำคัญ จากสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขี้้มมากเช่นแอลกอฮอล์หรือ สารสกัดจากน้ำ หากแต่กลับไม่ถูกนำไปใช้มากนัก เนื่องจากการนำสารสกัดในตัวทำละลายที่มี ขี้้มมากมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบเอกลักษณ์ ตลอดจนหาสูตรโครงสร้างทางเคมีนั้น ทำได้ยากกว่าการสกัดหาสารสำคัญจากตัวทำละลายที่มีขี้้มน้อย

จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคทาง คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกา เจล (silica gel) และชะด้วยตัว ทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ค่อยๆ เพิ่มขี้้มของตัวทำละลาย แล้วเก็บสารละลายที่ถูกแยกออกมา จากการพาของตัวทำละลายด้วยปริมาตรที่เหมาะสมเป็นส่วนๆ (fraction) จากนั้นนำแต่ละส่วนมา ตรวจสอบกลุ่มสาร ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง (thin layer chromatography) และ ใช้วิธีการตกผลึก (recrystallization) จนได้สารบริสุทธิ์

ภายหลังการสกัดและแยกจนได้สารบริสุทธิ์แล้ว ให้วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของ สารบนหลักพื้นฐานที่ว่า สารแต่ละชนิดจะแสดงข้อมูลทางสเปกตรัมชนิดต่างๆ เป็นเอกลักษณ์ เฉพาะตัว โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) อันได้แก่

- (1) การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสำคัญในตัวทำละลาย ด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (ultraviolet spectroscopy) เพื่อตรวจสอบว่าสารบริสุทธิ์นั้นเป็นสารอิมตัวหรือไม่ และมีคอนจูเกชันมากหรือน้อย
- (2) การวัดพลังงานที่เกิดจากการสั่นของโมเลกุล ด้วยวิธีการทางอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (infrared spectroscopy) เพื่อหาชนิดของหมู่ฟังก์ชันที่มีในโมเลกุลของสารบริสุทธิ์
- (3) การวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียส ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy) เพื่อกำหนดโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์
- (4) การให้โมเลกุลของสารสำคัญรับพลังงานมากพอที่เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน จนแตกตัว เป็นไอออนและมีประจุบวก ซึ่งหากมีพลังงานมากพอก็ยังสามารถแตกตัวออกเป็น ส่วนย่อยๆ จนไม่สามารถแตกตัวต่อไปได้อีก ด้วยวิธีการทางแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) เพื่อหามวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ และเพื่อยืนยัน โครงสร้าง ทางเคมี จากรูปแบบของการแตกโมเลกุลออกเป็นส่วนย่อยๆ (fragmentation pattern) ของสาร

หลังจากทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารแล้ว จึงตรวจสอบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยพิจารณาเปรียบเทียบค่าข้อมูลที่ได้เหล่านี้กับค่าของสารในกลุ่มเดียวกัน หรือสารสำคัญตัวเดียวกัน

กับที่เคยมีรายงานมาก่อน หากข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องกับสารชนิดใดก็สามารถสรุปได้ว่าเป็นสารชนิดนั้น ส่วนกรณีที่ได้ข้อมูลที่ได้ไม่ตรงกับสารชนิดใดเลย ก็มีความเป็นไปได้ที่สารสำคัญนั้นจะเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานการค้นพบมาก่อน (ตรีเพชร กาญจนภูมิ, 2552)

2.3 ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

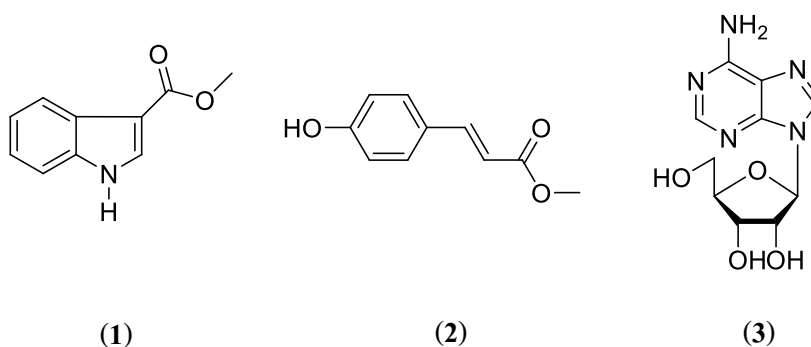
ผลการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า พืชสกุล *Euphorbia* จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลกประมาณ 2,000 ชนิด (Ernst et al., 2015; Shi, Su, and Kiyota, 2008) สำหรับในประเทศไทยพบรวม 32 ชนิด (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, สำนักงานหอพรรณไม้, 2557) และเนื่องจากที่ผ่านมา รายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของต้นหญ้ายาง ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Euphorbia heterophylla* Linn. มีเพียงชิ้นเดียวเท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสืบค้นงานวิจัยของพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกัน เพื่อพิจารณาเทียบเคียงองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ

Euphorbia heterophylla

Vamsidhar และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Antinociceptive Activity of *Euphorbia heterophylla* Roots” ผลการวิจัยพบว่า การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจ็บปวด (Antinociceptive) ในหนูทดลองจากรากของต้นหญ้ายาง พบสารสกัดชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์การยับยั้งอาการเจ็บปวด 25%, 56% และ 31% ตามลำดับ โดยผลการทดสอบสารสกัดทั้งหมด ให้ค่าทดสอบเป็นบวกสำหรับสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ หรือสเตอรอยด์ ซึ่งแสดงสัมประสิทธิ์ของฤทธิ์ยับยั้งอาการเจ็บปวดในหนู อันจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

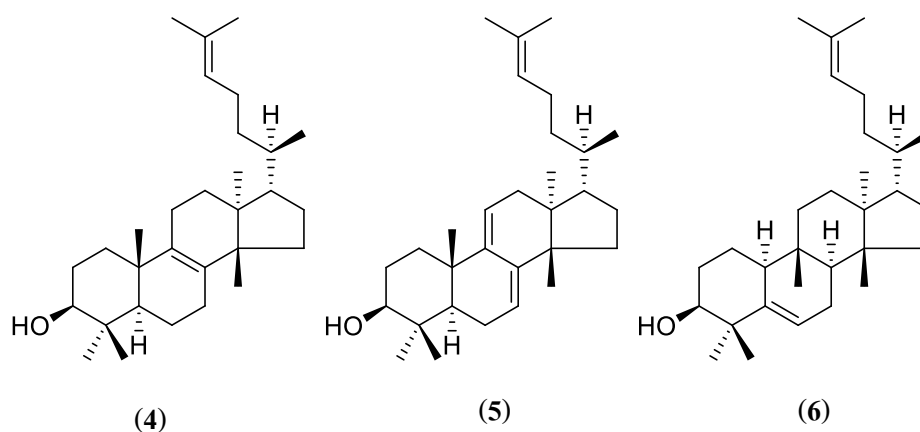
Fred-Jaiyesimi และ Abo (2010) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Phytochemical and Antimicrobial Analysis of the Crude Extract, Petroleum Ether and Chloroform Fractions of *Euphorbia heterophylla* Linn Whole Plant” ผลการวิจัยพบว่า ผลการวิเคราะห์ทางพิษเคมีเบื้องต้นจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง แสดงเอกลักษณ์ของกลุ่มสารอัลคาลอยด์ แทนนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และซาโปนิน ไกลโคไซด์ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสารสกัดหยาบส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง แสดงสัมประสิทธิ์การยับยั้งบนเซลล์ *Staph. albus*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella typhi* และ *Kleb. pneumoniae*

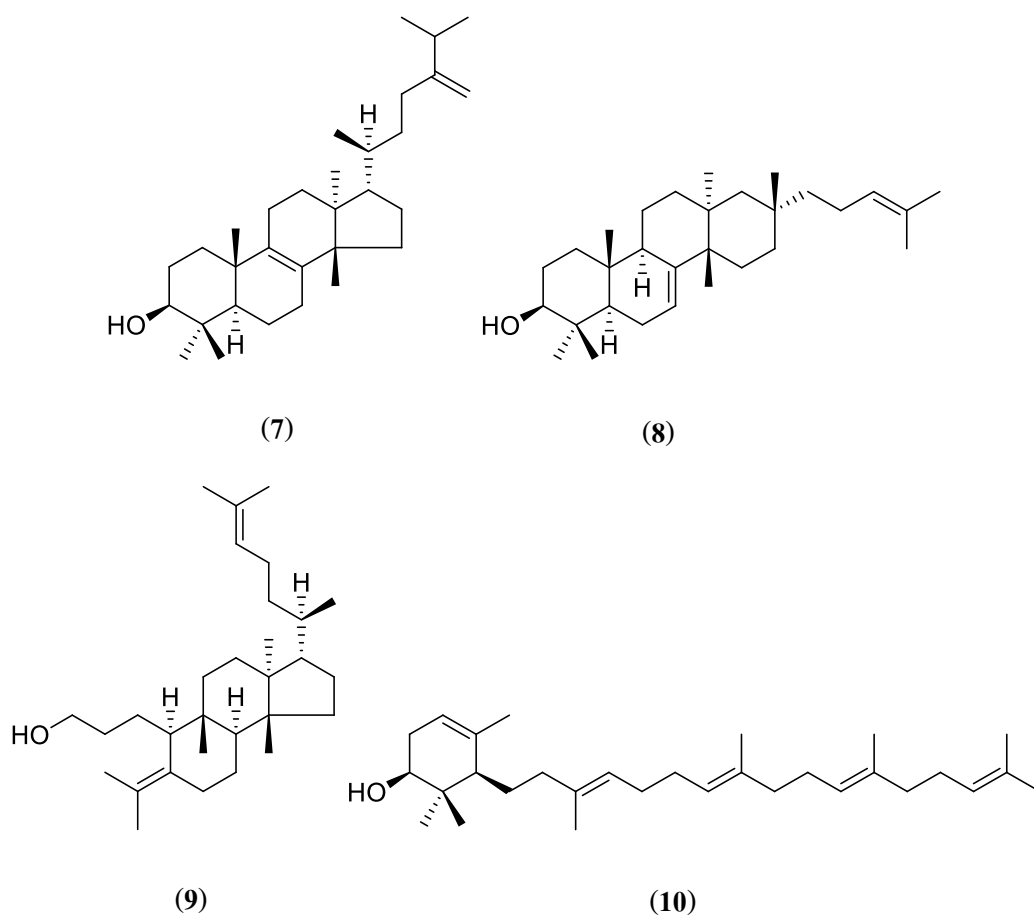
อรอุมา ภูประเสริฐ และอุทัย โสธนะพันธ์ (2544) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากลำต้นของหญ้ายาง” ผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของ *E. heterophylla* ในส่วนสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด ได้แก่ indole-3-methyl carboxylate (1) และ methyl-4-coumarate (2) และในส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด ได้แก่ adenosine riboside (3)



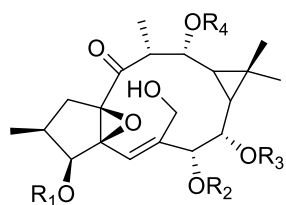
Euphorbia antiquorum

Akihisa และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol (“Antiquol C”) and Other Triterpenes from *Euphorbia antiquorum* Latex and Their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation” ผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีของพืช *E. antiquorum* ในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท พบสารบริสุทธิ์ในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ 7 ชนิด ได้แก่ euphol (4), antiquol C (5), antiquol B (6), euphorbol (7), lemmaphylla-7,21-dien-3 β -ol (8), isohelianol (9) และ camelliol C (10) โดยผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารชนิดที่ 1-4 และ 6 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 100% ในอัตราส่วน 1000 mol/TPA บน EBV-EA (Epstein-Barr Virus Early Antigen)

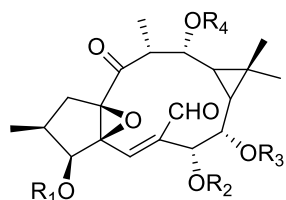




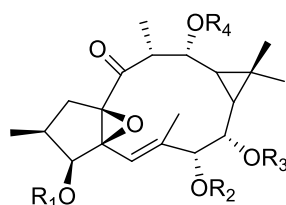
Qi และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Ingol-Type Diterpenes from *Euphorbia antiquorum* with Mouse 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibition Activity” ผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีจากส่วนเหนือดินของพืช *E. antiquorum* ในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท พบสารบริสุทธิ์กลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ 22 ชนิด ได้แก่ euphorantin A (11), euphorantin B (12), euphorantin C (13), euphorantin D (14), euphorantin E (15), euphorantin F (16), euphorantin G (17), euphorantin H (18), euphorantin I (19), euphorantin J (20), euphorantin K (21), euphorantin L (22), euphorantin M (23), euphorantin N (24), euphorantin O (25), 3,12-diacetyl-7-angeloyl-8-methoxyingol (26), 3,8,12-triacetyl-7-tigloylingol (27), 12-acetyl-7-angeloyl-8-methoxyingol (28), euphorantin P (29), euphorantin Q (30), euphorantin R (31) และ 3,12-diacetyl-7-benzoyl-8-nicotinylingol (32) โดยผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารชนิดที่ 11, 24 และ 32 มีฤทธิ์การยับยั้ง 11β -HSD1 มีค่า IC_{50} 12.0, 6.1 และ 0.41 μ M ตามลำดับ



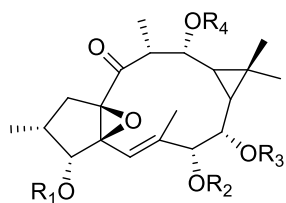
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(11)	Ac	Ang	Me	Ac
(12)	Ac	Bz	Me	Ac



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(13)	Ac	Ang	Me	Ac

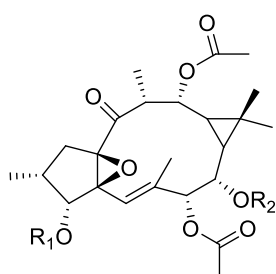


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(14)	Ac	A	Me	Ac
(15)	Ac	B	Me	Ac
(16)	Ac	Ac	Me	B
(17)	Ac	C	Me	Ac
(18)	Ac	Bz	Me	H
(19)	H	Bz	Me	Ac
(20)	H	Ang	Me	H

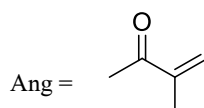
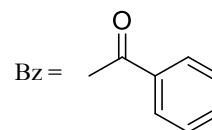
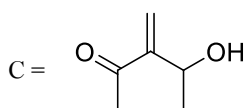
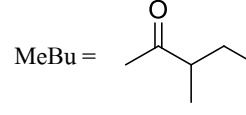
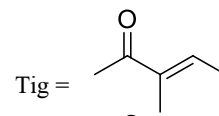


(21)	B	Ac	Ac	Ac
(22)	Ac	Ac	B	Ac
(23)	Ac	H	MeBu	Ac
(24)	H	Ac	MeBu	Ac
(25)	Ac	H	Bz	H
(26)	Ac	Ang	Me	Ac
(27)	Ac	Tig	Ac	Ac
(28)	H	Ang	Me	Ac

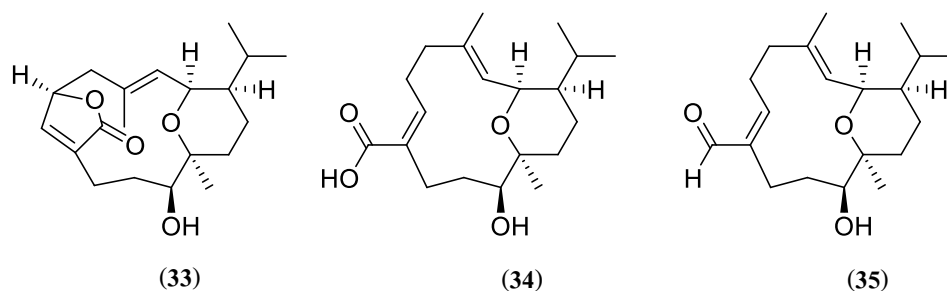
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(29)	Ac	A	Me	Ac
(30)	Ac	B	Me	Ac
(31)	Ac	Ac	Me	B



	R ₁	R ₂
(32)	Ac	Nic

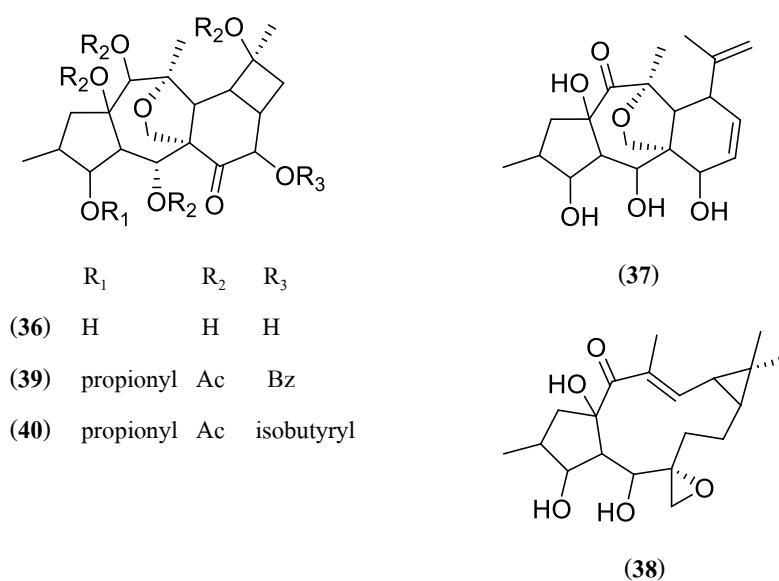


Qi และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Quorumolides A-C, Three Cembranoids from *Euphorbia antiquorum*” ผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีของพืช *E. antiquorum* ในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท พบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่ quorumolide A (33), quorumolide B (34) และ quorumolide C (35)

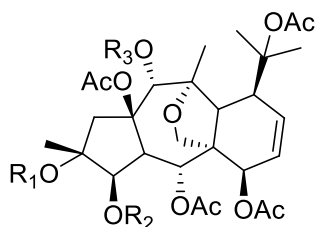


Euphorbia prolifera

Wu, Sorg และ Hecker (1995) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “New Myrsinol-Related Polyfunctional Pentacyclic Diterpene Esters from Roots of *Euphorbia prolifera*” ผลการวิจัยพบว่า ส่วนที่เป็นรากของพืช *E. prolifera* ในสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม มีองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์กลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ euphorbia substance SPr 1 (36), euphorbia substance SPr 2 (37), euphorbia substance SPr 3 (38), euphorbia substance SPr 4 (39) และ euphorbia substance SPr 5 (40)



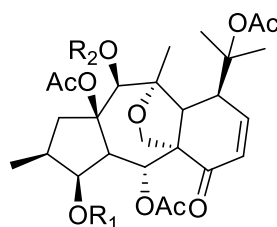
Xu และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Bioactive Myrsinol Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia prolifera*” ผลการวิจัยพบว่า ส่วนที่เป็นรากของพืช *E. prolifera* ในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท มีสารบริสุทธิ์ในกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ 19 ชนิด ได้แก่ euphorbiaproliferin A (41), euphorbiaproliferin B (42), euphorbiaproliferin C (43), euphorbiaproliferin D (44), euphorbiaproliferin E (45), euphorbiaproliferin F (46), euphorbiaproliferin G (47), euphorbiaproliferin H (48), euphorbiaproliferin I (49), euphorbiaproliferin J (50), 14-deoxo-3-*O*-propionyl-5,15-di-*O*-acetyl-7-*O*-benzoylmyrsinol-14 β -acetate (51), euphorprolitherin C (52), 14-deoxo-3-*O*-propionyl-5,15-di-*O*-acetyl-7-*O*-benzoylmyrsinol-14 β -nicotinoate (53), proliferin C (54), proliferin A (55), proliferin B (56), euphorprolitherin B (57), euphorbia substance SPr 5 (58) และ premyrsinol-3-propanoate-5-benzoate-7,13,17-triacetate (59)



R₁ R₂ R₃

(41) *i*Bu Prop *i*Bu

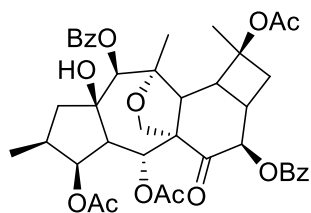
(42) Bz Bu Bz



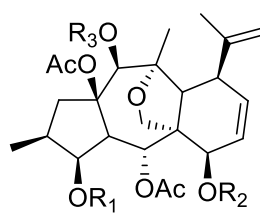
R₁ R₂

(43) *i*Bu Ac

(44) Prop Bz



(45)

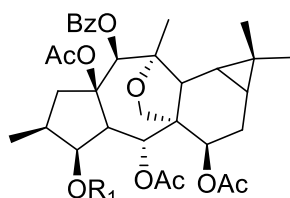


R₁ R₂ R₃

(46) Prop Ac Bz

(47) Prop Ac Ac

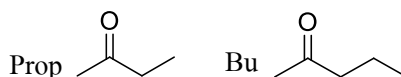
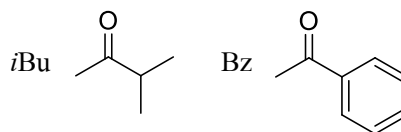
(48) Ac Bz Bz



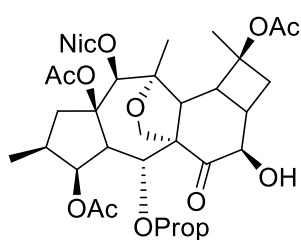
R₁

(49) Prop

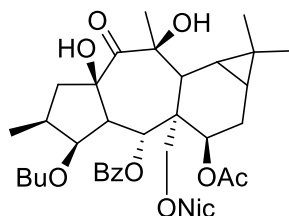
(50) Bu



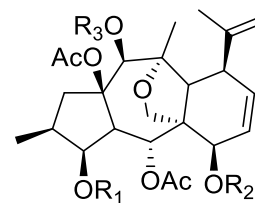
Xu และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Characterization of Diterpenes from *Euphorbia prolifera* and Their Antifungal Activities against Phytopathogenic Fungi” ผลการวิจัยพบว่าในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทของส่วนที่เป็นรากของพืช *E. prolifera* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเกิดเชื้อรา มีสารบริสุทธิ์กลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ 8 ชนิด ได้แก่ prolifepene A (60), prolifepene B (61), prolifepene C (62), prolifepene D (63), prolifepene E (64), prolifepene F (65), 2 α ,5 α ,7 β ,15 β -tetra-*O*-acetyl-3 β -*O*-propionyl-14 α -*O*-benzoyl-14-deoxomyrsinol (66) และ 3 β -*O*-propionyl-5 α ,10,15 β -tri-*O*-acetyl-14 β -*O*-nicotinoyl-7-oxo-10,18-dihydromyrsinol (67)



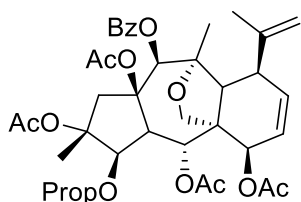
(60)



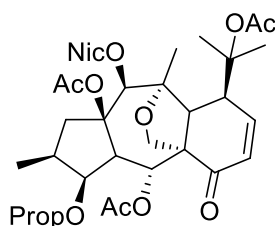
(61)

R₁ R₂ R₃

(62) Bu Ac Nic



(66)

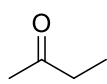


(67)

(63) Nic Bz Nic

(64) Prop Ac Nic

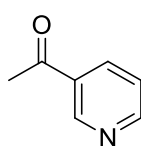
(65) Bu Nic Ac



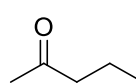
Prop



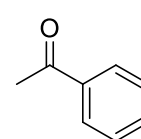
Ac



Nic



Bu

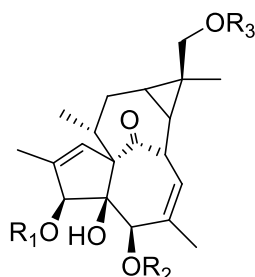


Bz

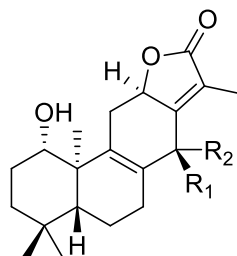
Euphorbia neriifolia

Zhao และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Eurifoloids A-R, Structurally Diverse Diterpenoids from *Euphorbia neriifolia*” ผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีในส่วนใบของพืช *E. neriifolia* ในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท มีสารบริสุทธิ์กลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ 18 ชนิด ได้แก่ eurifoloid A (68), eurifoloid B (69), eurifoloid C (70), eurifoloid D (71), eurifoloid E (72), eurifoloid F (73), eurifoloid G (74), eurifoloid H (75), eurifoloid I (76), eurifoloid J (77), eurifoloid K (78), eurifoloid L (79), eurifoloid M (80), eurifoloid N (81), eurifoloid O (82), eurifoloid P (83),

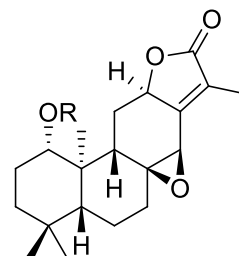
eurifoloid Q (84) และ eurifoloid R (85) โดยผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารชนิดที่ 72 และ 73 แสดงฤทธิ์การต้าน HIV ซึ่งมีค่า EC_{50} 3.58 ± 0.31 (SI = 8.6) และ $7.40 \pm 0.94 \mu\text{M}$ (SI = 10.3) ตามลำดับ



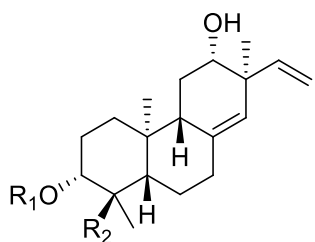
	R ₁	R ₂	R ₃
(68)	H	Ang	Tig
(69)	Ac	Ang	H



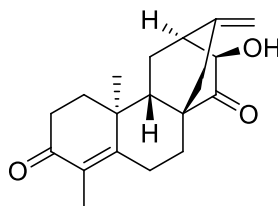
	R ₁	R ₂
(70)	H	OH
(71)	OH	H
(72)	OAc	H



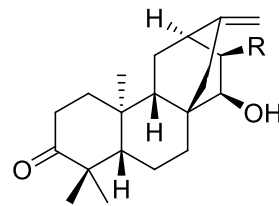
	R
(73)	H
(74)	Ac



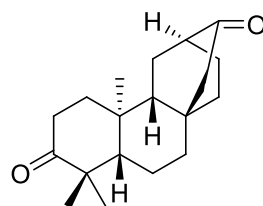
	R ₁	R ₂
(75)	H	CH ₂ OAc
(76)	H	CH ₂ OH
(77)	Ac	CHO
(78)	Ac	CO ₂ H
(79)	Ac	CH ₃



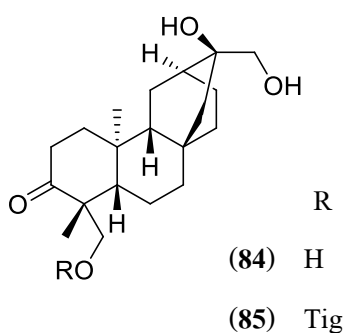
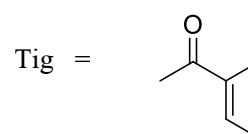
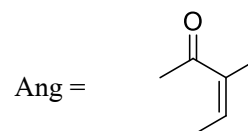
(80)



	R
(81)	OH
(82)	H

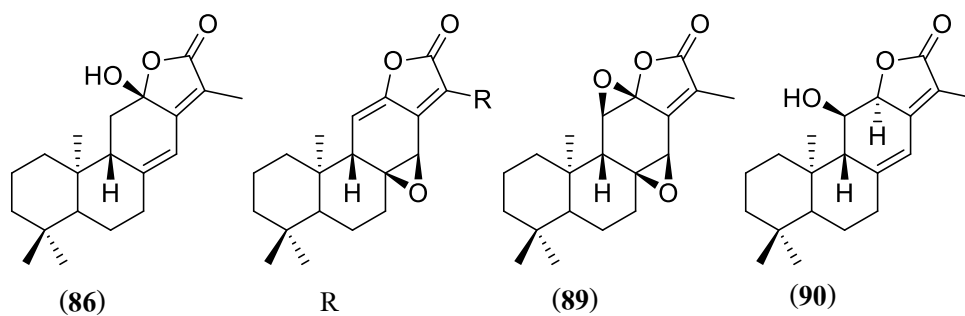
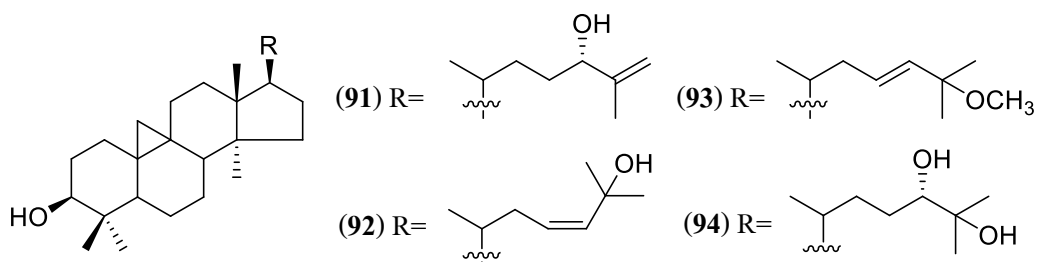


(83)



Euphorbia sessiliflora

Sutthivaiyakit และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง “Constituents and Bioactivity of the Tubers of *Euphorbia sessiliflora*” ผลการวิจัยพบว่า ส่วนหัวของพืช *E. sessiliflora* ในสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม พบสารบริสุทธิ์ 9 ชนิด ดังนี้ *ent*-12-Hydroxy-12[*R*]-abieta-8(14),13(15)-dien-16,12-olide (86), jolkinolide A (87), caudicifolin (88), jolkinolide B (89), *ent*-11 α -hydroxyabieta-8(14),13(15)-dien-16,12 α -olide (90), cycloart-25-en-3 β ,24-diol (91), cycloart-23 Z -en-3 β ,25-diol (92), 25-methoxy-cycloart-23 E -en-3 β -ol (93) และ cycloartan-3 β ,24,25-triol (94) โดยผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารชนิดที่ 87 มีฤทธิ์การยับยั้ง *M. catarrhalis* ที่ความเข้มข้น 50 μ g/ml และสารชนิดที่ 90 มีฤทธิ์การยับยั้ง *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. flavas*, *M. catarrhalis*, *N. sicca* และ *C. albicans* CBS 5763 ที่ 12.5 μ g/ml

(87) CH₃(88) CH₂OH

2.4 สรุป

จากการศึกษาค้นคว้าตำรา และบทความเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับเรื่องที่วิจัย ทั้งในด้านความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพืชสมุนไพร ทฤษฎีเกี่ยวกับการหาสารสำคัญในพืชสมุนไพร และผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง ทำให้ทราบว่า การสกัดแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพร และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร มีความสำคัญและจำเป็นยิ่งต่อการค้นหาชนิดของสารสำคัญ ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรค เพราะจะทำให้ได้ผลการป้องกันและรักษาที่มีประสิทธิผลมากกว่าการใช้พืชสมุนไพรโดยตรง และด้วยงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร ที่มีฤทธิ์ทางยาในกลุ่มวัชพืชยังมีไม่มากนัก ดังนั้นการสร้างองค์ความรู้จากงานวิจัยเรื่อง “องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง” จึงเป็นหนทางหนึ่งที่จะทำให้สามารถทราบชนิดของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในวัชพืชหญ้าหาง และทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับชนิดของสารสกัดหรือสารสำคัญ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นตัวกำหนดสรรพคุณทางยา อันจะเป็นแนวทางในการพัฒนาและสังเคราะห์ตัวยาได้เป็นลำดับต่อไป

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

การวิจัยเรื่อง “องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง” เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด และคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัด มีระเบียบวิธีการวิจัย ดังนี้

- 3.1 รูปแบบการวิจัย
- 3.2 ตัวอย่าง
- 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย
- 3.4 เครื่องมือการวิจัย
- 3.5 สถานที่ทำการวิจัย
- 3.6 การรวบรวมข้อมูล
- 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีลักษณะเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) โดยผ่านวิธีการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด แล้วนำข้อมูลที่รวบรวมได้มาสังเคราะห์ เพื่อสรุปผลการศึกษาตามขอบข่ายของการวิจัย

3.2 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง ที่เก็บจาก หมู่ 12 บ้านสะเดาพัฒนา ตำบลเทพรักษา อำเภอสังขะ จังหวัดสุรินทร์ น้ำหนักรวม (ใบและต้น) 12.4 กิโลกรัม

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนต่างๆ รวม 3 ขั้นตอน ดังนี้

(1) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง

และการตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

(1.1) การเตรียมตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์

นำต้นหญ้ายางที่เก็บรวบรวมได้มาคัดแยกเอาเฉพาะส่วนเหนือดิน (ใบและลำต้น) แล้วนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ และผึ่งลมในที่ร่มจนแห้งสนิท เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา

(1.2) การสกัดสารสำคัญจากพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายางที่แห้งแล้วมาสับให้มีขนาดเล็ก บดให้ค่อนข้างละเอียด ชั่งน้ำหนัก บรรจุลงในถังสแตนเลส แล้วสกัดโดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (เฮกเซน) จนท่วมส่วนเหนือดินที่อุณหภูมิห้อง คนให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิทเพื่อป้องกันการระเหย ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้งเป็นเวลาครั้งละ 7 วัน โดยกวนเป็นครั้งคราว เมื่อครบกำหนดเวลาในแต่ละครั้ง นำสารสกัดที่ได้มากรองแยกเอากากออกผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บสารละลายสีที่สกัดได้รวมกันไว้ทั้ง 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนกากที่เหลือมาสกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยวิธีการสกัดแบบเดียวกัน แต่เปลี่ยนใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงขึ้น ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ

(1.3) การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำสารละลายสีที่สกัดได้แต่ละส่วนมาทำให้เข้มข้น โดยระเหยแห้งเอาตัวทำละลายออกภายใต้การลดความดัน ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งมีลักษณะขุ่นเหนียว ชั่งน้ำหนัก

(1.4) การตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

แบ่งสารสกัดหยาบที่เข้มข้นดังกล่าวในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด

(1.5) การนำสารสกัดหยาบมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

- นำสารสกัดหยาบที่เข้มข้นในชั้น ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับบรรจุอยู่ในคอลัมน์แก้ว และมีระบบตัวทำละลายของเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ในสัดส่วนต่างๆ เป็นตัวพา

- รองรับสารละลายที่ถูกแยกออกมาจากการพาของตัวทำละลาย ด้วยปริมาตรที่เหมาะสมเป็นส่วนตัว จากนั้นนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบกลุ่มสาร ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิดแผ่นบาง (Thin layer chromatography: TLC) โดยใช้วิธี colour detection ด้วยการป้ายน้ำยา anisaldehyde sulfuric acid reagent แล้วให้ความร้อน ร่วมกับการตรวจสอบจุดที่บ่งแสงภายใต้แสง UV

ที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร และตรวจสอบจุดเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 366 นาโนเมตร

- รวมสารที่ผ่านการตรวจสอบว่าเป็นส่วนผสมของสารกลุ่มเดียวกันไว้ด้วยกัน เป็นส่วนย่อยลำดับต่างๆ แล้วนำส่วนย่อยที่สนใจมาแยกซ้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาที่เป็นส่วนผสมของตัวทำละลายที่เหมาะสม (จากการตรวจสอบด้วย TLC) จนกระทั่งได้สารบริสุทธิ์

(2) การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ระบุแห้งแห้ง ตกผลึก และหาจุดหลอมเหลว (หากเป็นของแข็ง) และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีขั้นสูง ได้แก่ อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี แมสสเปกโทรสโกปี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ แล้วพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้

(3) สรุปผลการวิจัยและจัดทำเป็นรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

3.4 เครื่องมือการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูล ประกอบด้วยอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือต่างๆ ดังนี้

อุปกรณ์

บีกเกอร์ กระบอกตวง กรวยกรอง ซ้อนคัสสาร แท่งแก้วคน ปิเปตต์ ลูกยาง ขวดรูปกรวย กระชอนาฬิกา หลอดทดลอง อลูมิเนียมฟอยล์ ถังสแตนเลสสำหรับแช่สกัดพืชสมุนไพร อุปกรณ์ที่ใช้ในงานโครมาโทกราฟีแบบทีนเลเซอร์และแบบคอลัมน์

เครื่องมือ

- เครื่องชั่งแบบหยาบ
- เครื่องหาจุดหลอมเหลว
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง
- เครื่องกลั่นแบบลำดับส่วน
- เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน
- เครื่องวัดการโพลาไรซ์ optical rotation โพลาริมิเตอร์

(JASCO DIP 1020)

- เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ Infrared Spectrophotometer (Perkin-Elmer 1760x FT-IR), Mass Spectrometer (Bruker Daltonics micro TOF) และ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AVANCE III HD 400 MHz)

สารเคมี

- ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น ได้แก่ เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และ เมทานอล
- สารดูดซับ สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี
 - : Silica gel G60 ขนาด 60-200 μm (70-230 mesh)
 - : Silica gel P60 ขนาด 40-63 μm (230-400 mesh)
 - : Lichrolut (RP-18; 40-63 μm)
 - : Sephadex LH-20
- รีเอเจนต์สำหรับตรวจสอบสารบนแผ่น Thin Layer Chromatography
 - : anisaldehyde sulfuric acid reagent
(anisaldehyde: conc. H_2SO_4 : H_2O : ethanol ในอัตราส่วน 8: 12: 16: 392)
- ตัวทำละลายสำหรับการวิเคราะห์ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

3.6 การรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- การแยกสารสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี
- การทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นไคคลอโรมีเทน และสารสกัดชั้นเมทานอล

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีแบบต่างๆ และวิเคราะห์ผลทดสอบการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นไคคลอโรมีเทน และสารสกัดชั้นเมทานอล

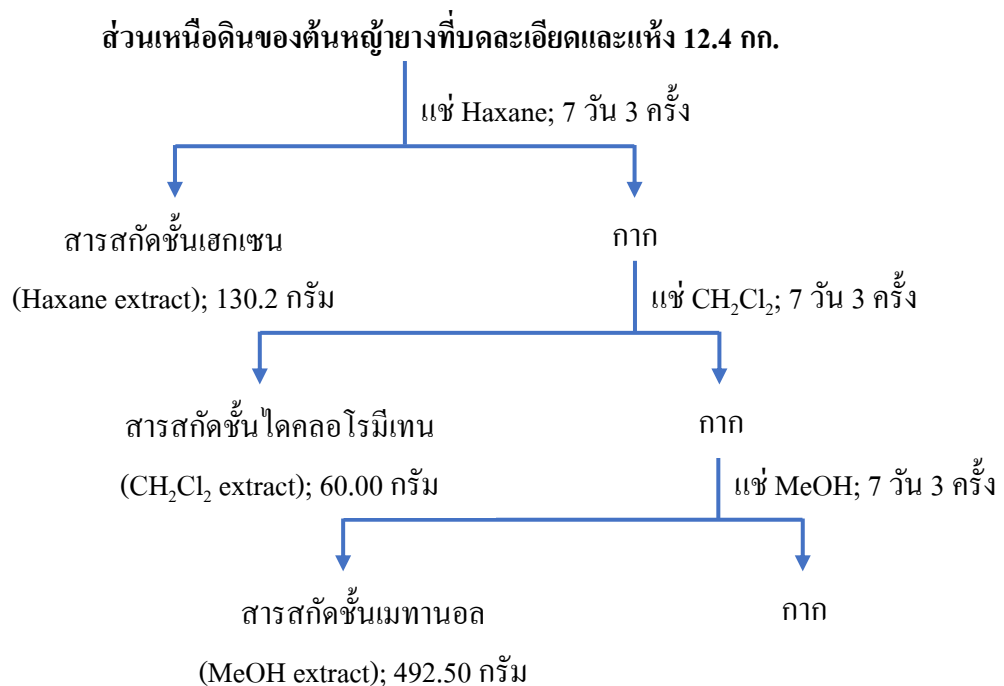
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง

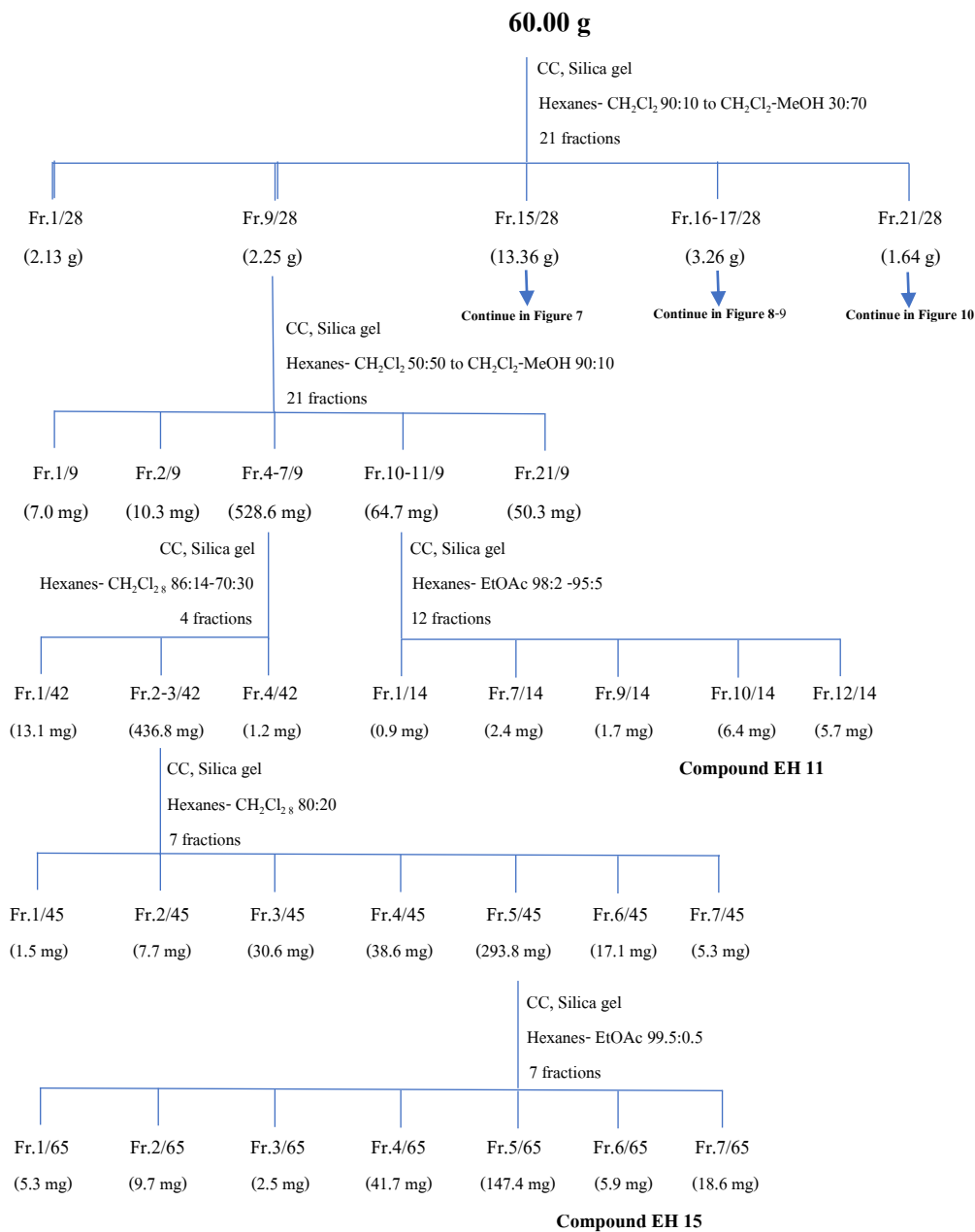
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในส่วนเหนือดิน (ใบและลำต้น) ของต้นหญ้ายาง ที่ถูกบดละเอียดและมีน้ำหนักรวม 12.4 กิโลกรัม โดยผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายตามลำดับสภาพขั้วจากต่ำมาหาสูง โดยใช้เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล แล้วนำสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน (dichloromethane extract) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นเหนียวหนืดสีน้ำตาลอมเขียว น้ำหนัก 60 กรัม และสารสกัดชั้นเมทานอล (methanol extract) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ น้ำหนัก 492.50 กรัม มาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังแสดงในภาพประกอบ 5-13

พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้รวม 15 ชนิด ซึ่งเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร ทำให้ทราบว่าเป็นสารกลุ่ม megastigmane 8 ชนิด กลุ่ม diterpene 2 ชนิด กลุ่ม triterpene 2 ชนิด และกลุ่ม sterol 3 ชนิด



ภาพประกอบ 5 แผนผังการสกัดแยกสารจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง

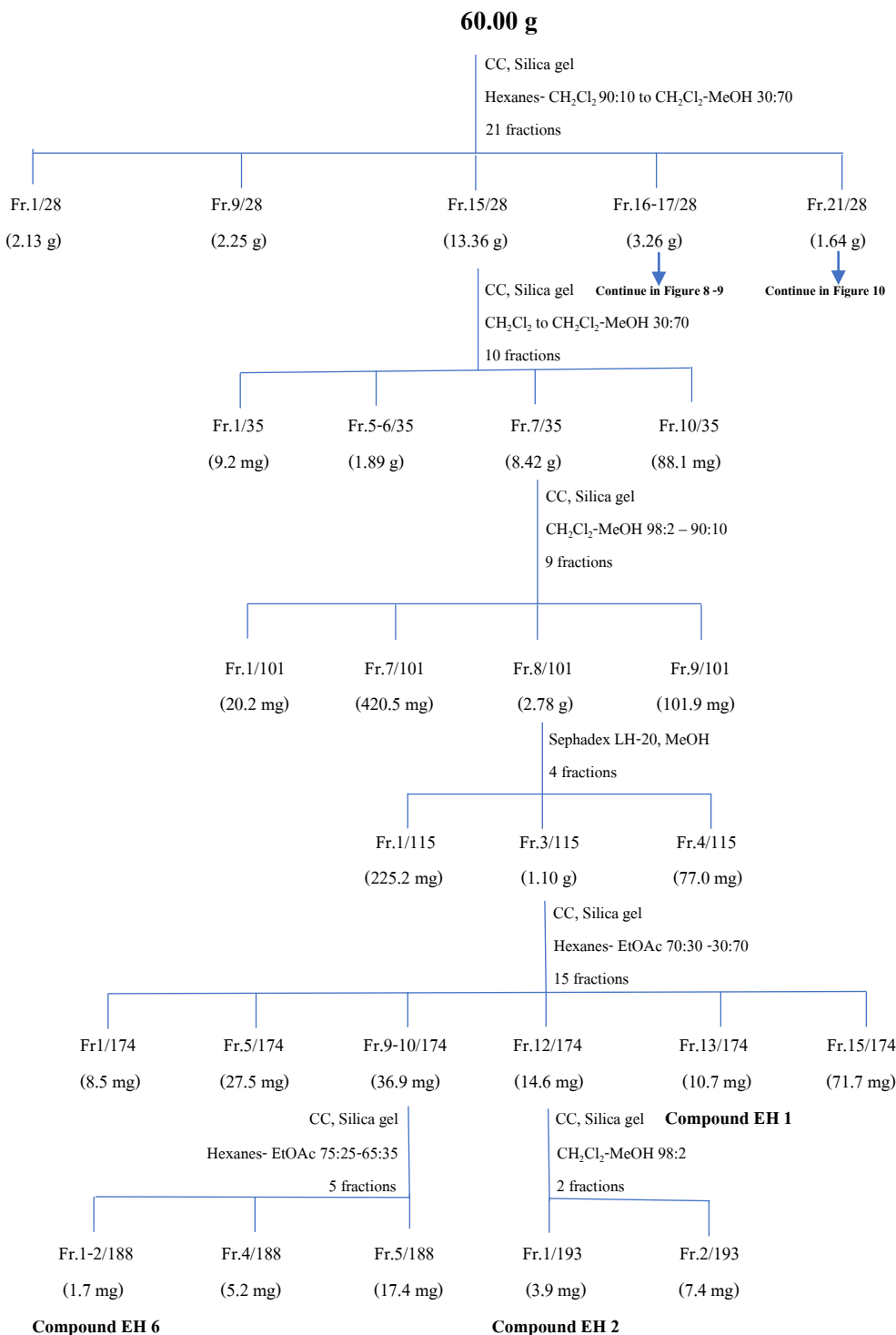
Crude CH_2Cl_2 Extract (EH-A- CH_2Cl_2)



ภาพประกอบ 6 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 11 และ EH 15

จากสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง

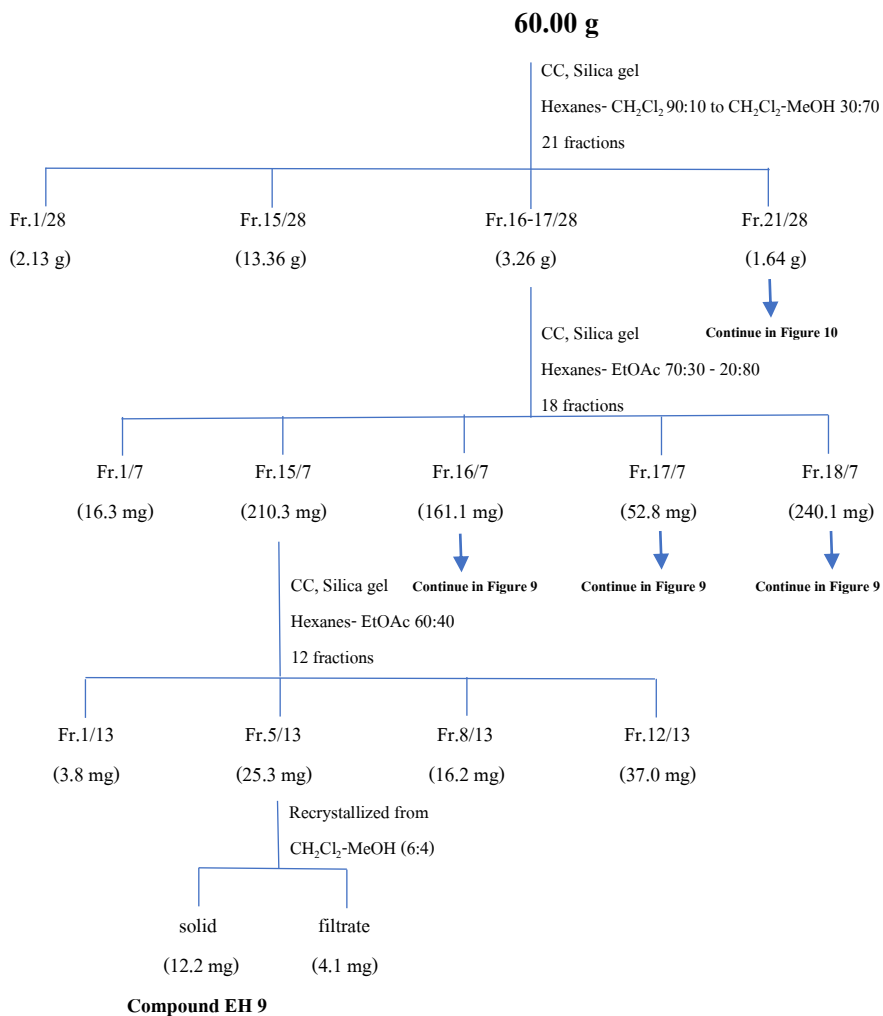
Crude CH₂Cl₂ Extract (EH-A- CH₂Cl₂) (continued)



ภาพประกอบ 7 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 1, EH 2 และ EH 6

จากสารสกัดชั้น CH₂Cl₂ ส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง

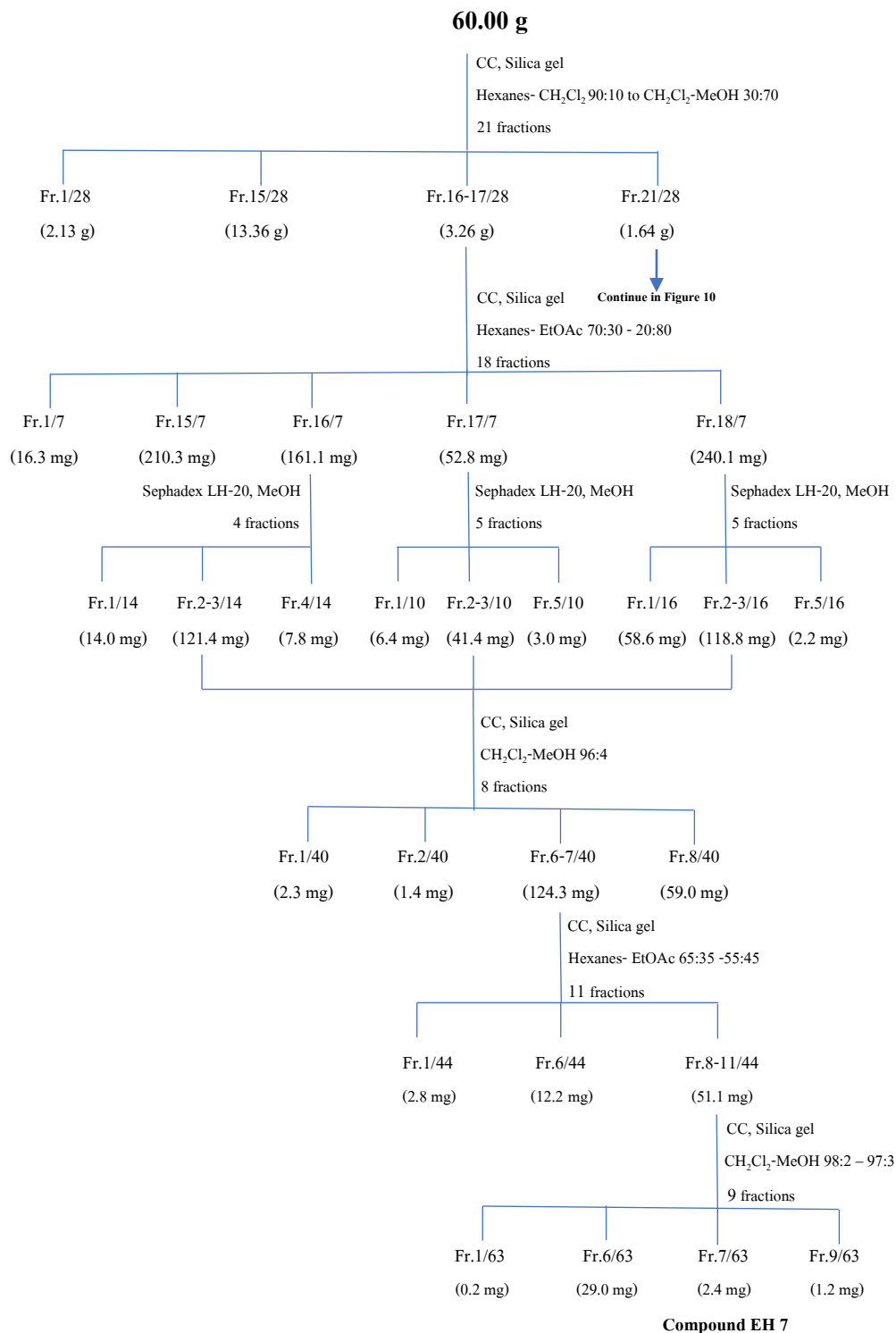
Crude CH₂Cl₂ Extract (EH-A- CH₂Cl₂) (continued)



ภาพประกอบ 8 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 9

จากสารสกัดชั้น CH₂Cl₂ ส่วนเหนือดินของต้นหญ้าขจรยี่

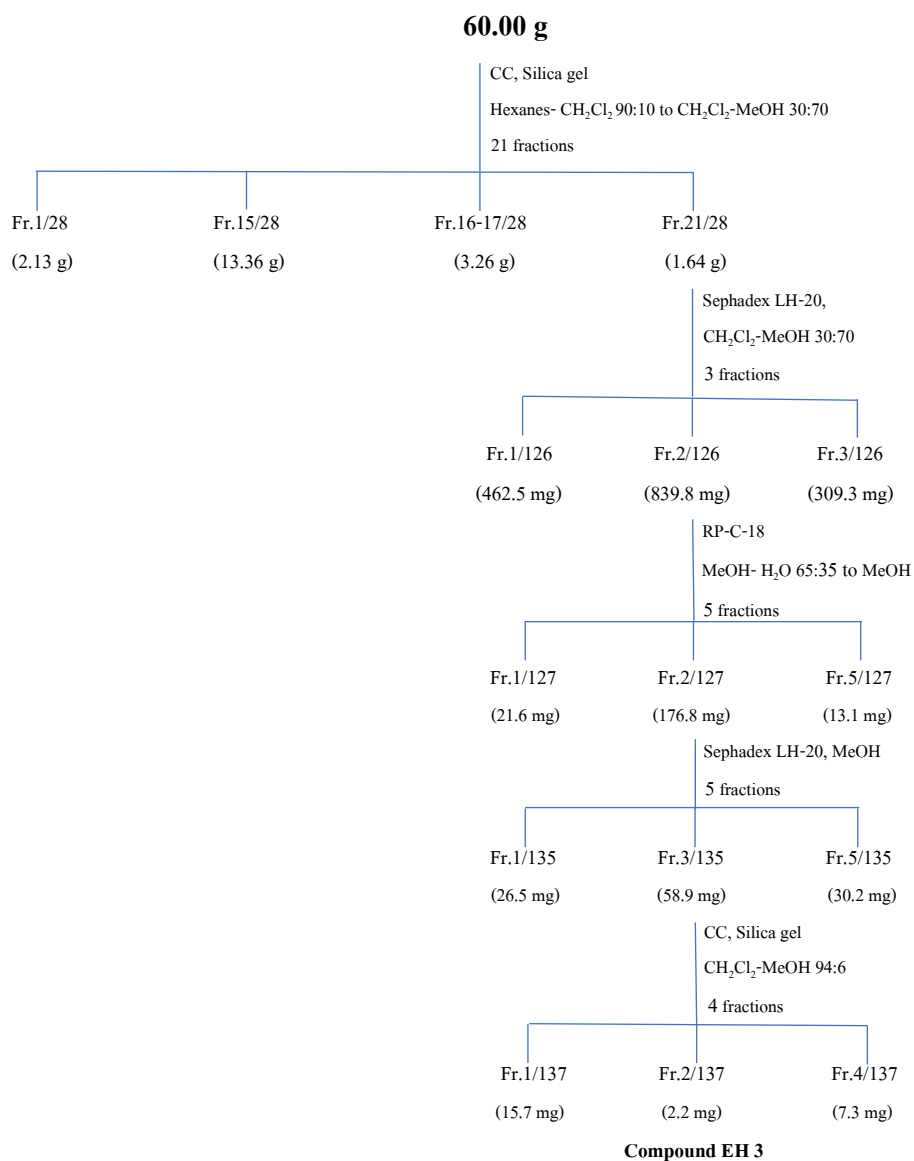
Crude CH₂Cl₂ Extract (EH-A- CH₂Cl₂) (continued)



ภาพประกอบ 9 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 7

จากสารสกัดชั้น CH₂Cl₂ ส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง

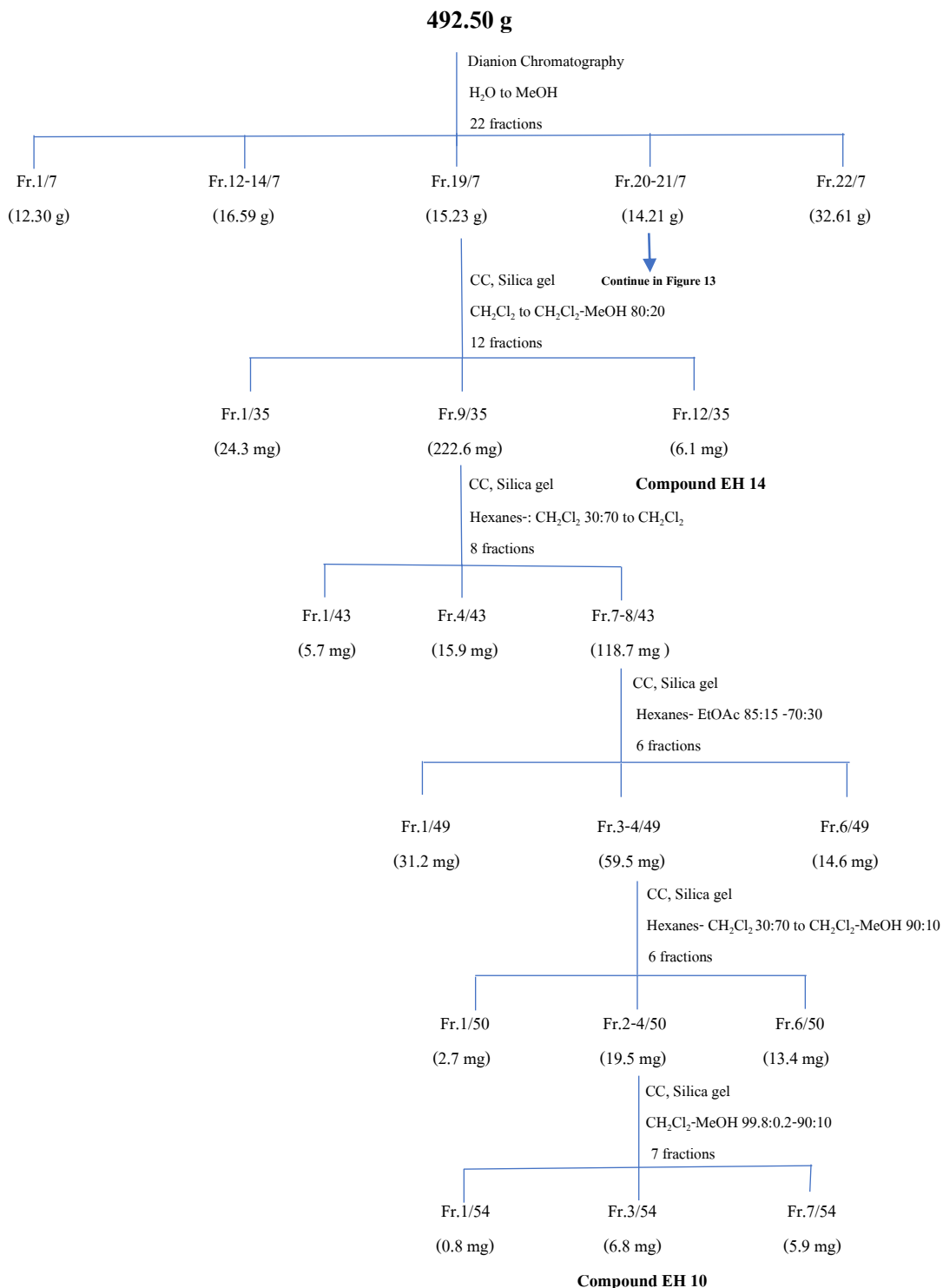
Crude CH₂Cl₂ Extract (EH-A-CH₂Cl₂) (continued)



ภาพประกอบ 10 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 3

จากสารสกัดชั้น CH₂Cl₂ ส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง

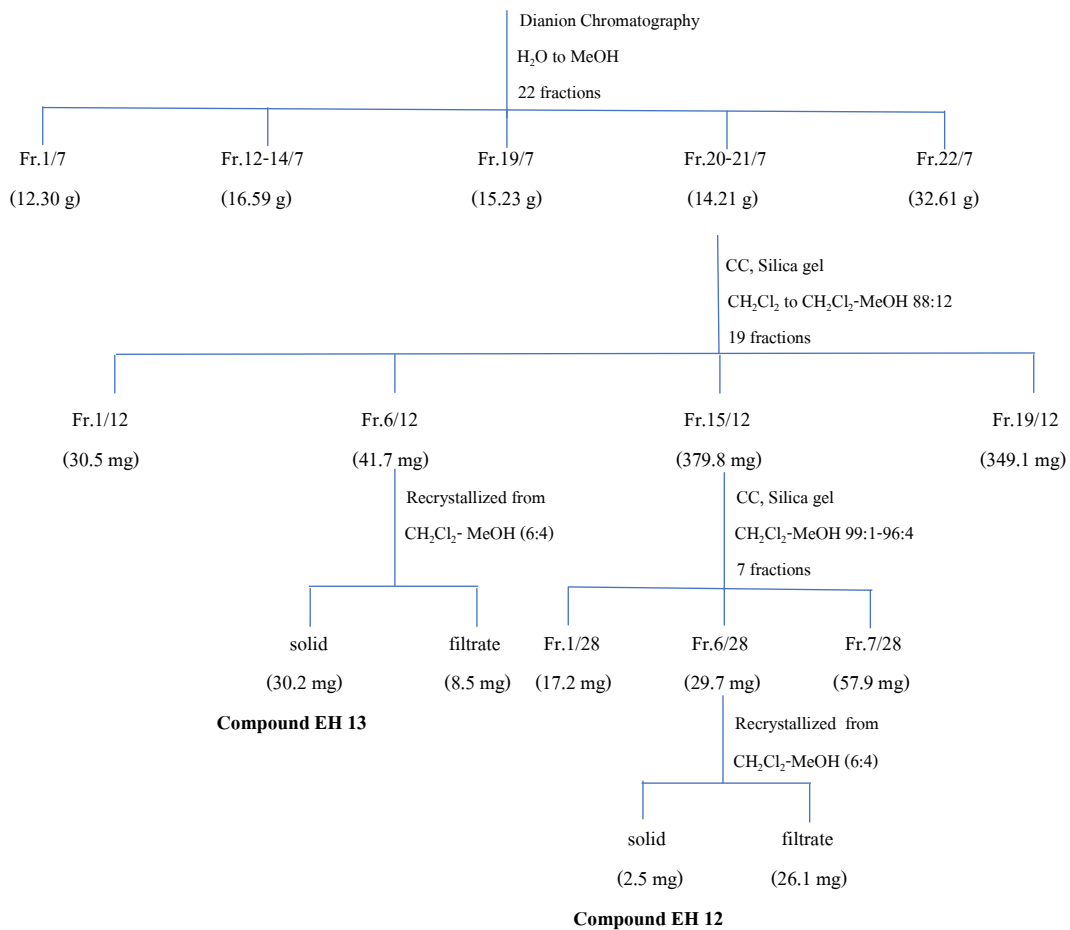
Crude MeOH Extract (EH-A- MeOH) (continued)



ภาพประกอบ 12 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound **EH 10** และ **EH 14**
จากสารสกัดชั้น MeOH ส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง

Crude MeOH Extract (EH-A- MeOH) (continued)

492.50 g



ภาพประกอบ 13 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์ Compound EH 12 และ EH 13
จากสารสกัดชั้น MeOH ส่วนเหนือดินของต้นหญ้าหาง

4.2 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 1

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 1

สารประกอบ EH 1 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 10.7 มิลลิกรัม ได้จากการนำสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) มาผ่านกระบวนการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane- CH_2Cl_2 (90:10) จนถึง CH_2Cl_2 -MeOH (30:70) ได้สารทั้งหมด 21 ส่วนย่อย (Fr. 1-21/28) ดังแสดงในภาพประกอบ 7

นำ Fr. 15/28 (13.36 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH_2Cl_2 จนถึง CH_2Cl_2 -MeOH (30:70) ได้สารทั้งหมด 10 ส่วนย่อย (Fr. 1-10/35) นำ Fr. 7/35 (8.42 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (98:2-90:10) ได้สารทั้งหมด 9 ส่วนย่อย (Fr. 1-9/101) นำ Fr. 8/101 (2.78 กรัม) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/115) นำ Fr. 3/115 (1.10 กรัม) มาแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (70:30-30:70) ได้สารทั้งหมด 15 ส่วนย่อย (Fr. 1-15/174) เมื่อนำ Fr. 13/174 (10.7 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 1

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 1

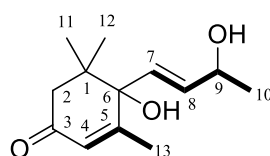
สารประกอบ EH 1 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 10.7 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3355 cm^{-1} (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2979, 2964, 2935 และ 2868 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1657 cm^{-1} (C=O stretching) ของหมู่ carbonyl ที่ ν_{max} 1590 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{max} 1431, 1370 และ 1329 cm^{-1} (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1277, 1243, 1179, 1120, 1070 และ 1020 cm^{-1} (C-O stretching) ของ alcohol ที่ ν_{max} 971, 913, 878, 845 และ 809 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 225.1489 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3$, 225.1485) ดังนั้นสูตรโมเลกุลของสารประกอบ EH 1 คือ $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3$

^{13}C -NMR spectrum แสดงสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 13 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างนี้ประกอบด้วย methyl carbon 4 อะตอม methylene carbon 1 อะตอม methine carbon 4 อะตอม quaternary carbon 2 อะตอม oxygenated tertiary carbon 1 อะตอม และ carbonyl carbon 1 อะตอม (δ_{C} 198.0)

$^1\text{H-NMR}$ spectrum ปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 1.26 (d, $J = 6.4$ Hz), 0.98 (s), 1.04 (s) และ 1.86 (s) กำหนดเป็น methyl proton ของตำแหน่ง H_3 -10, H_3 -11, H_3 -12 และ H_3 -13 ตามลำดับ ยืนยันได้จาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-10/C-8 (δ_{C} 135.7), C-9 (δ_{C} 68.0); H-11, H-12/C-1 (δ_{C} 41.1), C-2 (δ_{C} 49.6), C-6 (δ_{C} 79.0) และ H-13/C-4 (δ_{C} 126.8), C-5 (δ_{C} 162.8), C-6 ตามลำดับ สัญญาณที่ δ_{H} 5.75 (d, $J = 15.7$ Hz) และ 5.82 (dd, $J = 15.7, 6.0$ Hz) เป็น olefinic methine proton ของตำแหน่ง H-7 และ H-8 ตามลำดับ ยืนยันได้ทั้งจาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-7/C-6, C-8, C-9 และ H-8/C-6, C-7 (δ_{C} 129.0), C-9, C-10 (δ_{C} 23.7) รวมทั้ง $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ spectra ที่แสดง correlation จาก H-7 [δ_{H} 5.75 (d, $J = 15.7$ Hz)], H-8 [δ_{H} 5.82 (dd, $J = 15.7, 6.0$ Hz)], H-9 [δ_{H} 4.37 (quint, $J = 6.0$ Hz)] จนถึง H-10 [δ_{H} 1.26 (d, $J = 6.4$ Hz)] ดังแสดงในภาพประกอบ 14



— H-H COSY

ภาพประกอบ 14 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ Correlations ของสารประกอบ EH 1

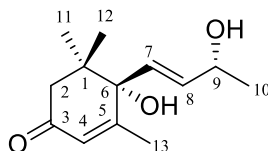
การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ EH 1 อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HSQC และ HMBC ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ blumenol A (Cuttillo et al., 2005) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบว่าสารประกอบ EH 1 มีโครงสร้างทางเคมีที่มี planar structure เหมือนสารกลุ่ม megastigmane ที่มีชื่อว่า blumenol A (Bercht et al., 1976; Cuttillo et al., 2005; Galbraith and Horn, 1973; Weiss, Koreeda, and Nakanishi, 1973) หรือ vomifoliol (Andersson and Lundgren, 1988; Bercht et al., 1976; Demole and Enggist, 1974; Hammami et al., 2004; Powell and Smith, 1981) ดังแสดงในภาพประกอบ 14

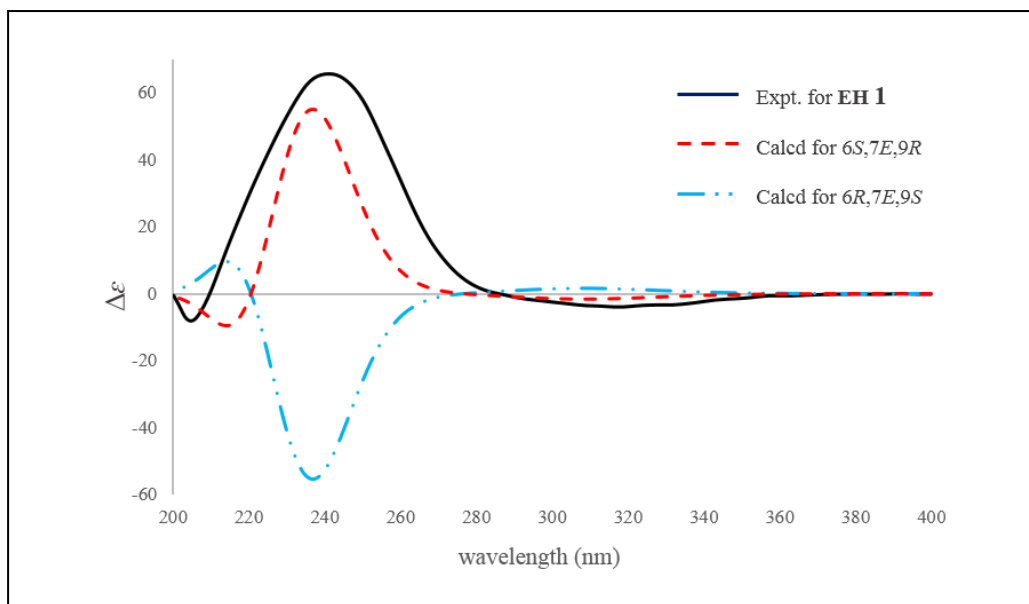
เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ EH 1; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +117.74$ (c 1.07, CHCl_3) และของสารประกอบ vomifoliol ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +41$ (c 0.01, CHCl_3) (Hammami et al., 2004) พบเป็นค่า positive เหมือนกัน นั่นแสดงว่าสารประกอบ EH 1 มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (6*S*, 7*E*, 9*R*) เหมือนกับสารประกอบ vomifoliol

ทั้งนี้ สามารถพิสูจน์โครงสร้างสเตอริโอเคมีได้จากการเปรียบเทียบ Experimental ECD ของสารประกอบ **EH 1** [ให้ค่า positive cotton effect ที่ความยาวคลื่น 241 nm ($\Delta\epsilon_{241} +65.53$) และ negative cotton effect ที่ความยาวคลื่น 318 nm ($\Delta\epsilon_{318} -3.93$)] กับ Calculated ECD ที่มาจากวิธีการคำนวณ Electronic Circular Dichroism (ECD) บนพารามิเตอร์ single point energy, time-dependent density functional theory (TDDFT) method และ CAM-B3LYP/6-31G (2d,p) level ซึ่งพบว่าสารประกอบ **EH 1** มีสเตอริโอเคมีที่สอดคล้องกับรูปแบบ (6*S*, 7*E*, 9*R*) ดังแสดงในภาพประกอบ 15

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 1** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (6*S*, 7*E*, 9*R*) โดยมีชื่อว่า blumenol A หรือ vomifoliol ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Echiochilon fruticosum* (Hammami et al., 2004) และ *Cannabis sativa* L. (Bercht et al., 1976)



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 1**



ภาพประกอบ 15 การเปรียบเทียบ Experimental ECD กับ Calculated ECD ของสารประกอบ **EH 1**

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ blumenol A

กับสารประกอบ EH 1 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 1

Position	blumenol A*		สารประกอบ EH 1 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	41.2, C	-	41.1, C	-
2	2.43 d (17.0) 2.24 d (17.0)	49.6, CH ₂	2.41 d (17.0) 2.20 d (17.0)	49.6, CH ₂	C-1, 3, 4, 6, 11
3	-	197.8, C	-	198.0, C	-
4	5.89 s	126.6, CH	5.87 br s	126.8, CH	C-2, 5, 6, 13
5	-	161.7, C	-	162.8, C	-
6	-	78.9, C	-	79.0, C	-
7	5.78 d (15.0)	131.7, CH	5.75 d (15.7)	129.0, CH	C-6, 8, 9
8	5.84 m	131.5, CH	5.82 dd (15.7, 6.0)	135.7, CH	C- 6, 7, 9, 10
9	4.41 m	70.2, CH	4.37 quint (6.0)	68.0, CH	C-7, 8, 10
10	1.30 d (6.5)	20.5, CH ₃	1.26 d (6.4)	23.7, CH ₃	C-8, 9
11	1.10 s	24.6, CH ₃	0.98 s ^a	24.0, CH ₃ ^b	C-1, 2, 3, 6, 12
12	1.03 s	22.8, CH ₃	1.04 s ^a	22.8, CH ₃ ^b	C-1, 2, 6, 11
13	1.92 s	18.9, CH ₃	1.86 s	18.8, CH ₃	C-4, 5, 6

^{a, b}Interchangeable signals.

*(Cutillo et al., 2005)

4.3 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 2

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 2

สารประกอบ EH 2 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 3.9 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.15/28 (13.36 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 7

โดยเมื่อนำ Fr. 15/28 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH_2Cl_2 จนถึง CH_2Cl_2 -MeOH (30:70) ได้สารทั้งหมด 10 ส่วนย่อย (Fr. 1-10/35) นำ Fr. 7/35 (8.42 กรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (98:2-90:10) ได้สารทั้งหมด 9 ส่วนย่อย (Fr. 1-9/101) นำ Fr. 8/101 (2.78 กรัม) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/115) นำ Fr. 3/115 (1.10 กรัม) มาแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (70:30-30:70) ได้สารทั้งหมด 15 ส่วนย่อย (Fr. 1-15 /174) เมื่อนำ Fr. 12/174 (14.6 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (98:2) ได้สารทั้งหมด 2 ส่วนย่อย (Fr.1-2/193) เมื่อนำ Fr. 1/193 (3.9 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 2

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 2

สารประกอบ EH 2 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 3.9 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3432 cm^{-1} (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2963, 2929, และ 2976 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1717 และ 1662 cm^{-1} (C=O stretching) ของหมู่ carbonyl ที่ ν_{max} 1425, 1313 และ 1365 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene และ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1257, 1179 และ 1027 cm^{-1} (C-O stretching) ของ alcohol ที่ ν_{max} 988, 915 และ 879 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z (257.0949)[M+Cl]⁺ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{ClO}_3$, 257.0940) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 2 คือ $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$

¹³C-NMR spectrum แสดงสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 13 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาพร้อมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon

4 อะตอม methylene carbon 1 อะตอม methine carbon 3 อะตอม quaternary carbon 2 อะตอม oxygenated tertiary carbon 1 อะตอม และ carbonyl carbon 2 อะตอม (δ_c 196.8 และ 197.2)

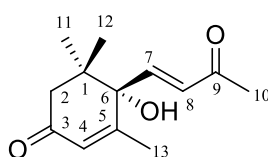
เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ **EH 2** กับ **EH 1** พบมีค่าสัญญาณคล้ายกัน ยกเว้นที่ δ_H 6.80 (d, $J = 15.7$ Hz), 6.44 (d, $J = 15.7$ Hz) และ 2.28 (s) ซึ่งแสดงสัญญาณ low field กว่าของสารประกอบ **EH 1** และกำหนดให้เป็นของ H-7, H-8 และ H₃-10 ตามลำดับ โดยยืนยันได้จาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-7/C-1 (δ_c 41.4), C-5 (δ_c 160.2), C-6 (δ_c 79.2), C-8 (δ_c 130.3), C-9 (δ_c 197.2); H-8/C-6, C-7 (δ_c 144.9), C-9, C-10 (δ_c 28.3) และ H-10/C-9

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 2** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HSQC และ HMBC ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ (+)-dehydrovomifoliol (Kai, Baba, and Okuyama, 2007) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบว่าสารประกอบ **EH 2** มีโครงสร้างทางเคมีที่มี planar structure เหมือนกับสารประกอบ dehydrovomifoliol (Park et al., 2011)

เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 2**; $[\alpha]_D^{25} +164.87$ (c 0.39, MeOH) และของสารประกอบ (+)-dehydrovomifoliol ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ $[\alpha]_D^{28} +138.96$ (c 0.424, MeOH) (Kai, et al., 2007), $[\alpha]_D^{20} +134.4$ (c 0.11, MeOH) (Kim et al., 2004) และ $[\alpha]_D^{20} +219$ (c 0.10, CHCl_3) (Park et al., 2011) พบเป็นค่า positive เหมือนกัน นั้นแสดงว่าสารประกอบ **EH 2** มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีที่ตำแหน่ง chiral carbon ของ C-6 เป็น (6*S*) เหมือนกับสารประกอบ (+)-dehydrovomifoliol

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 2** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (6*S*) และมีชื่อว่า (+)-dehydrovomifoliol หรือ (S)-dehydrovomifoliol (Park et al., 2011) หรือ (6*S*)-dehydrovomifoliol (Hao et al., 2013) ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Teucrium viscidum* (Hao et al., 2013) และ *Cucumis sativus* (Kai, et al., 2007)



สูตร โครงสร้างของสารประกอบ **EH 2**

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

(+)-dehydrovomifoliol กับสารประกอบ EH 2 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 2

Position	(+)-dehydrovomifoliol*		สารประกอบ EH 2 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	42.6, C	-	41.4, C	-
2	2.59 d (18.3) 2.28 d (18.3)	50.4, CH ₂	2.47 d (17.3) 2.31 d (17.3)	49.5, CH ₂	C-1, 3, 4, 6, 11, 12
3	-	199.9, C	-	196.8, C	-
4	5.93 s	127.7, CH	5.93 br s	127.8, CH	C-2, 6, 13
5	-	164.2, C	-	160.2, C	-
6	-	79.8, C	-	79.2, C	-
7	6.99 d (15.7)	148.0, CH	6.80 d (15.7)	144.9, CH	C- 1, 5, 6, 8, 9
8	6.43 d (15.7)	131.4, CH	6.44 d (15.7)	130.3, CH	C- 6, 7, 9, 10
9	-	200.1, C	-	197.2, C	-
10	2.30 s	27.6, CH ₃	2.28 s	28.3, CH ₃	C- 9
11	1.06 s	23.5, CH ₃	1.08 s ^a	22.9, CH ₃ ^b	C-1, 2, 6, 12
12	1.01 s	24.7, CH ₃	1.00 s ^a	24.3, CH ₃ ^b	C-1, 2, 3, 6, 11
13	1.89 d (1.5)	19.1, CH ₃	1.86 d (1.1)	18.6, CH ₃	C-4, 5, 6

^{a, b}Interchangeable signals.

*(Kai, et al., 2007)

4.4 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 3

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 3

สารประกอบ EH 3 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 2.2 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.21/28 (1.64 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 10

โดยเมื่อนำ Fr.21/28 มาแยกด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (30:70) แยกสารได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย (Fr. 1-3/126) นำ Fr. 2/126 (839.8 มิลลิกรัม) มาแยกด้วย reversed phase silica gel RP-18 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ MeOH-H₂O (65:35-100:0) ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/127) นำ Fr. 2/127 (176.8 มิลลิกรัม) มาแยกด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH แยกสารได้ทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/135) จากนั้นนำ Fr. 3/135 (58.9 มิลลิกรัม) มาแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (94:6) ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/137) เมื่อนำ Fr. 2/137 (2.2 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 3

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 3

สารประกอบ EH 3 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 2.2 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3367 cm^{-1} (br, O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2963, 2928 และ 2871 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1711 และ 1674 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{max} 1454, 1378 และ 1365 cm^{-1} (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1261, 1145, 1050 และ 1032 cm^{-1} (C-O stretching) ของ alcohol ที่ ν_{max} 978, 948, 907 และ 867 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 267.1561 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}$, 267.1566) ดังนั้นสูตรโมเลกุลของสารประกอบ EH 3 คือ $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$

^{13}C -NMR spectrum ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 13 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 4 อะตอม methylene carbon 2 อะตอม methine carbon 4 อะตอม quaternary carbon 1 อะตอม และ oxygenated tertiary carbon 2 อะตอม

เมื่อเปรียบเทียบกับ ^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 3 กับ EH 1 พบมีลักษณะคล้ายกัน ยกเว้นที่สารประกอบ EH 3 มีสัญญาณที่ δ_{H} 4.03 (dddd, $J = 12.2, 12.0, 6.3, 3.4$ Hz)

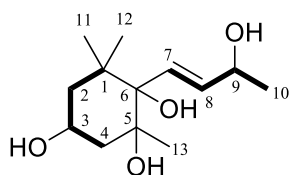
ซึ่งกำหนดให้เป็นของ H-3 แสดงว่าตำแหน่ง C-3 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล รวมทั้งยังปรากฏสัญญาณ high fields ที่ δ_{H} 1.80 (dd, $J = 12.2, 3.4$ Hz) และ 1.67 (t, $J = 12.2$ Hz) กำหนดให้เป็นของ H₂-4 ยืนยันได้จาก ¹H-¹H COSY spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-2 [δ_{H} 1.55 (t, $J = 12.0$ Hz), 1.50 (dd, $J = 12.0, 3.4$ Hz)]/H-3, H-3/H-4 และ cross-peaks จาก H-7 [δ_{H} 6.00 (d, $J = 15.8$ Hz)], H-8 [δ_{H} 5.70 (dd, $J = 15.8, 6.0$ Hz)], H-9 [δ_{H} 4.35 (quint, $J = 6.0$ Hz)] จนถึง H-10 [δ_{H} 1.25 (d, $J = 6.0$ Hz)] ดังแสดงในภาพประกอบ 16 รวมทั้งยังมี HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-3/C-1 (δ_{C} 39.4), C-2 (δ_{C} 45.0), C-4 (δ_{C} 44.5), C-5 (δ_{C} 76.6) และ H-4/C-2, C-3 (δ_{C} 64.0), C-5, C-13 (δ_{C} 26.3) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ high field ที่ δ_{H} 0.79 (s) และ 1.10 (s) ซึ่งเมื่อเทียบกับสัญญาณโปรตอนของสารประกอบ **EH 1** กำหนดเป็นของ H₃-12 และ H₃-13 ตามลำดับ โดยยืนยันได้จาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-12/C-1, C-2, C-6 (δ_{C} 77.3), C-11 (δ_{C} 25.3) และ H-13/C-4, C-5, C-6

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ¹H และ ¹³C-NMR ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 3** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก ¹H-¹H COSY, HSQC และ HMBC ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ¹H และ ¹³C-NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (Otsuka et al., 2003) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 3**; $[\alpha]_{\text{D}}^{31} -26.84$ (c 0.19, MeOH) และของสารประกอบ (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -21.1$ (c 0.38, MeOH) (Otsuka et al., 2003) และ $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -25.1$ (c 0.99, MeOH) (Yu et al., 2002) พบเป็นค่า negative เหมือนกัน นั่นแสดงว่าสารประกอบ **EH 3** มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*S*, 5*R*, 6*R*, 7*E*, 9*S*) เหมือนกัน

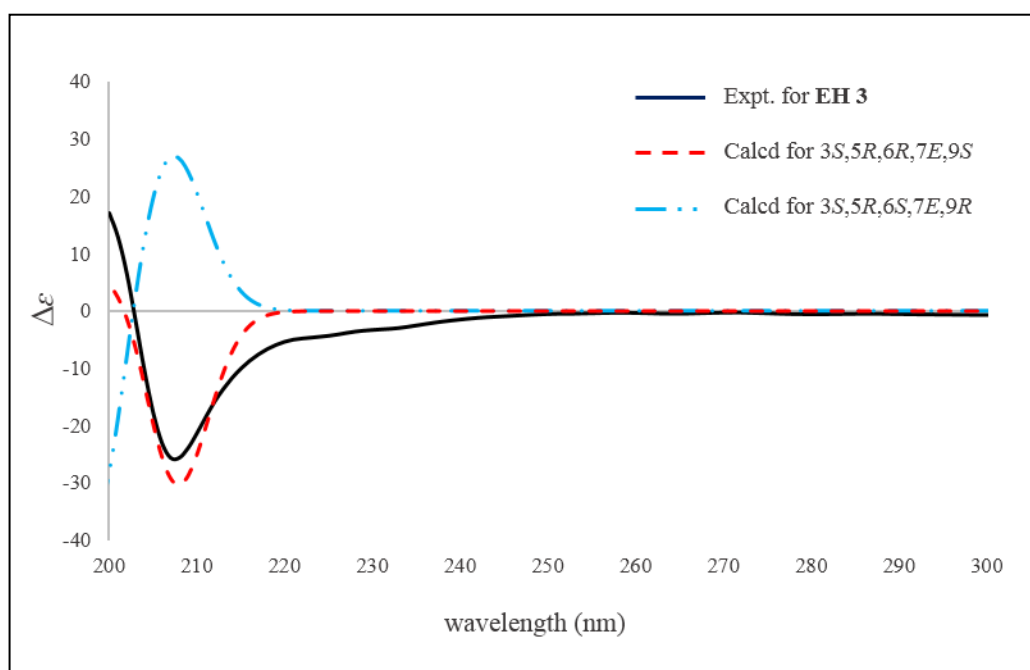
ทั้งนี้ สามารถพิสูจน์ยืนยันสเตอริโอเคมีที่ตำแหน่ง chiral carbon ได้จากการเปรียบเทียบ Experimental ECD ของสารประกอบ **EH 3** และ Calculated ECD พบว่า สารประกอบ **EH 3** ให้ค่า negative cotton effect ที่ความยาวคลื่น 207 nm ($\Delta\epsilon_{207} -25.61$) ซึ่งสอดคล้องกับสเตอริโอเคมีรูปแบบ (3*S*, 5*R*, 6*R*, 7*E*, 9*S*) ดังแสดงในภาพประกอบ 17

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 3** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*S*, 5*R*, 6*R*, 7*E*, 9*S*) และมีชื่อว่า (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (Otsuka et al., 2003) หรือ (3*S*,5*R*,6*R*,9*S*)-3,5,6,9-tetrahydroxymegastigmane (Yu et al., 2002) ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Teucrium viscidum* (Hao et al., 2013) และ *Turpinia ternata* (Yu et al., 2002)

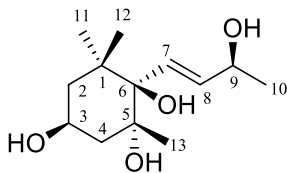


— H-H COSY

ภาพประกอบ 16 ^1H - ^1H COSY Correlations ของสารประกอบ EH 3



ภาพประกอบ 17 การเปรียบเทียบ Experimental ECD กับ Calculated ECD ของสารประกอบ EH 3



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol กับสารประกอบ **EH 3**

และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ **EH 3**

Position	3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>S</i> - megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol*		สารประกอบ EH 3 (CDCl ₃ + 3 drops CD ₃ OD)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	40.8, C	-	39.4, C	-
2	1.65 t (12) 1.45 ddd (12, 4, 2)	46.6, CH ₂	1.55 t (12.0) 1.50 dd (12.0, 3.4)	45.0, CH ₂	C-1, 3, 4, 6, 11, 12
3	4.06 m	65.4, CH	4.03 dddd (12.2, 12.0, 6.3, 3.4)	64.0, CH	C-1, 2, 4, 5
4	1.78 ddd (13, 5, 2) 1.73 dd (11, 2)	45.8, CH ₂	1.80 dd (12.2, 3.4) 1.67 t (12.2)	44.5, CH ₂	C-2, 3, 5, 13
5	-	77.8, C	-	76.6, C	-
6	-	79.0, C	-	77.3, C	-
7	6.07 dd (16, 1)	131.2, CH	6.00 d (15.8)	129.8, CH	C-6, 8, 9
8	5.79 dd (16, 6)	136.2, CH	5.70 dd (15.8, 6.0)	134.9, CH	C-6, 7, 9, 10
9	4.34 quint d (6, 1)	69.6, CH	4.35 quint (6.0)	68.3, CH	C-7, 8, 10
10	1.27 d (6)	24.1, CH ₃	1.25 d (6.0)	23.6, CH ₃	C-8, 9
11	1.22 s	27.6, CH ₃	1.17 s ^a	25.3, CH ₃ ^b	C-1, 2, 6, 12
12	0.88 s	26.2, CH ₃	0.79 s ^a	26.5, CH ₃ ^b	C-1, 2, 3, 6, 11
13	1.10 s	27.1, CH ₃	1.10 s	26.3, CH ₃	C-3, 4, 5, 6

^{a, b}Interchangeable signals.

*(Otsuka et al., 2003)

4.5 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 4

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 4

สารประกอบ EH 4 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 21.4 มิลลิกรัม แยกได้จากการนำสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) มาผ่านกระบวนการแยกด้วย Dianion Chromatography โดยใช้ตัวพาระบบ 100% H₂O จนถึง 100% MeOH ได้สารทั้งหมด 22 ส่วนย่อย (Fr. 1-22/7) ดังแสดงในภาพประกอบ 11

โดยเมื่อนำ Fr. 12-14/7 (16.59 กรัม) มาแยกด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/57) นำ Fr. 2/57 (6.75 กรัม) มาแยกอีกครั้งด้วย reversed phase silica gel RP-18 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ MeOH-H₂O (10:90) จนถึง 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/58) นำ Fr. 3/58 (1.25 กรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH₂Cl₂-MeOH (96:4-80:20) แยกสารได้ทั้งหมด 11 ส่วนย่อย (Fr. 1-11/61) เมื่อนำ Fr.10/61 (21.4 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 4

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 4

สารประกอบ EH 4 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 21.4 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{\max} 3326 cm⁻¹ (br, O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 2965, 2927 และ 2876 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1713, 1652 และ 1564 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{\max} 1447, 1371 และ 1310 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1264, 1231, 1072 และ 1019 cm⁻¹ (C-O stretching) ของ alcohol และ ether ที่ ν_{\max} 991 และ 862 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 429.2133 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₃₄O₉Na, 429.2091) ดังนั้นสูตรโมเลกุลของสารประกอบ EH 4 คือ C₁₉H₃₄O₉

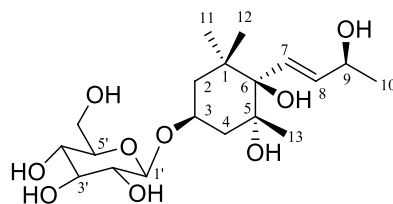
¹³C-NMR spectrum ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 19 อะตอม เมื่อพิจารณา ร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 4 อะตอม methylene carbon 3 อะตอม methine carbon 9 อะตอม quaternary carbon 1 อะตอม และ oxygenated tertiary carbon 2 อะตอม [ในจำนวนนี้เป็น glucosyl carbon 6 อะตอม (δ_c 102.2, 78.0, 77.7, 75.0, 71.6 และ 62.6)]

เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ **EH 4** กับ **EH 3** พบว่ามีสัญญาณคล้ายกัน ยกเว้นมีการเพิ่มสัญญาณของ glucosyl group ที่ δ_{H} 4.40 (d, $J = 7.8$ Hz) และ δ_{H} 3.85-3.13 โดยมีค่า chemical shift δ_{H} 4.40 (d, $J = 7.8$ Hz) เป็นลักษณะสัญญาณ anomeric proton H-1' ของ glucosyl group รวมทั้งมีข้อมูลจาก $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ NMR long-range correlations spectrum แสดงสัญญาณ cross-peaks ระหว่าง H-1'/C-3 (δ_{C} 73.2), C-3' (δ_{C} 78.0) ที่บ่งชี้ได้ว่ามีหมู่ glucosyl เกาะที่ตำแหน่ง C-3 และจาก $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum ที่แสดงสัญญาณการเชื่อมต่อกันของโปรตอนของหมู่ glucosyl จาก H-1', H-2' [δ_{H} 3.13 (t, $J = 8.3$ Hz)], H-3' [δ_{H} 3.35 (t, $J = 8.6$ Hz)], H-4' (δ_{H} 3.30), H-5' (δ_{H} 3.28) และ H-6' [δ_{H} 3.85 (dd, $J = 11.9, 1.7$ Hz), 3.67 (dd, $J = 11.9, 5.4$ Hz)] ตามลำดับ

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 4** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HSQC และ HMBC ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (Otsuka et al., 2003) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

จากรูปแบบ proton coupling constant ของ H-3 ที่ δ_{H} 4.18 ที่ปรากฏสัญญาณเป็น dddd ด้วยค่า $J = 11.7, 11.7, 4.4, 4.3$ Hz ที่บ่งชี้ว่าตำแหน่ง H-3 มี orientation เป็น α และการเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 4**; [α]_D³¹ -14.27 (c 1.24, MeOH) กับของสารประกอบ (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ [α]_D²⁴ -38.0 (c 1.00, MeOH) (Otsuka et al., 2003) พบเป็นค่า negative เหมือนกัน นั้นแสดงว่าสารประกอบ **EH 4** มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*S*, 5*R*, 6*R*, 7*E*, 9*S*) เหมือนกัน

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 4** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*S*, 5*R*, 6*R*, 7*E*, 9*S*) และมีชื่อว่า (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Glochidion zeylanicum* (Otsuka et al., 2003)



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 4**

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside

กับสารประกอบ EH 4 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 4

Position	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-megastigman-7-ene- 3,5,6,9-tetrol-3- <i>O</i> - β -D- glucopyranoside*		สารประกอบ EH 4 (CD ₃ OD)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	40.9, C	-	40.7, C	-
2	1.73 t (12.0) 1.59 ddd (12.0, 4.0, 2.0)	44.6, CH ₂	1.72 dd (12.0, 7.1) 1.57 ddd (12.4, 4.0, 1.7)	44.4, CH ₂	C-1, 3, 4, 6, 11, 12
3	4.19 tt (12.0, 4.0)	73.4, CH	4.18 dddd (11.7, 11.7, 4.4, 4.3)	73.2, CH	C-1', 2
4	1.95 ddd (13.0, 4.0, 2.0) 1.77 dd (13.0, 12.0)	42.5, CH ₂	1.94 ddd (13.0, 3.9, 1.7) 1.76 dd (11.8, 7.2)	42.3, CH ₂	C-2, 3, 5, 6, 13
5	-	77.8, C	-	77.7, C	-
6	-	79.2, C	-	79.1, C	-
7	6.07 dd (16.0, 1.0)	131.0, CH	6.04 d (15.8)	131.0, CH	C-6, 8, 9, 10
8	5.79 dd (16.0, 6.0)	136.2, CH	5.77 dd (15.8, 6.2)	136.1, CH	C-6, 9, 10
9	4.34 quint d (6.0, 1.0)	69.2, CH	4.33 quint (6.3)	69.5, CH	C-7, 8, 10
10	1.27 d (6.0)	24.0, CH ₃	1.26 d (6.4)	24.1, CH ₃	C-8, 9
11	1.12 s	27.6, CH ₃	1.19 s ^b	26.2, CH ₃ ^c	C-1, 2, 6, 12
12	0.88 s	26.3, CH ₃	0.83 s ^b	27.4, CH ₃ ^c	C-1, 2, 3, 6, 11
13	1.22 s	27.2, CH ₃	1.14 s	27.1, CH ₃	C-3, 4, 5, 6
1'	4.41 d (8.0)	102.3, CH	4.40 d (7.8)	102.2, CH	C-3, 3'
2'	3.15 t (8.0)	75.2, CH	3.13 t (8.3)	75.0, CH	C-1', 3'
3'		78.2, CH	3.35 t (8.6)	78.0, CH	C-2', 4', 5'
4'		71.8, CH	3.30 ^a	71.6, CH	C-2', 3', 5', 6'
5'		77.9, CH	3.28 ^a	77.7, CH	C-3', 4', 6'
6'	3.86 dd (12.0, 2.0) 3.68 dd (5.0, 2.0)	62.8, CH ₂	3.85 dd (11.9, 1.7) 3.67 dd (11.9, 5.4)	62.6, CH ₂	C-4', 5'

^aOverlapped signals.

^{b, c}Interchangeable signals.

*(Otsuka et al., 2003)

4.6 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 5

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 5

สารประกอบ EH 5 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 2.2 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr. 12-14/7 (16.59 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 11

โดยเมื่อนำ Fr. 12-14/7 มาแยกด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/57) นำ Fr. 2/57 (6.75 กรัม) มาแยกด้วย reversed phase silica gel RP-18 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ MeOH-H₂O (10:90) จนถึง 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/58) นำ Fr. 2/58 (3.75 กรัม) มาแยกต่อด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ แยกสารได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (Fr. 1-8/59) นำ Fr. 3-4/59 (1.23 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH₂Cl₂-MeOH (92:8-90:10) แยกสารได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (Fr. 1-8/63) จากนั้นนำ Fr.5/63 (61.3 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH แยกสารได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย (Fr. 1-3/67) นำ Fr.2/67 (12.9 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยนำมาแยกด้วย reversed phase silica gel RP-18 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ MeOH-H₂O (20:80) เป็นตัวพาระบบ ได้สารทั้งหมด 3 ส่วนย่อย (Fr. 1-3/70) เมื่อนำ Fr.2/70 (2.2 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 5

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 5

สารประกอบ EH 5 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 2.2 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{\max} 3326 cm⁻¹ (br, O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 2963, 2922 และ 2878 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1646 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{\max} 1452, 1418 และ 1369 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1319, 1285, 1103, 1072, 1026 และ 1016 cm⁻¹ (C-O stretching) ของ alcohol และ ether ที่ ν_{\max} 985, 935 และ 884 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 429.2123 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₃₄O₉Na, 429.2091) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 5 คือ C₁₉H₃₄O₉,

¹³C-NMR spectrum (100 MHz, CDCl₃) ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 19 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อพิจารณาพร้อมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้

ประกอบด้วย methyl carbon 4 อะตอม methylene carbon 3 อะตอม methine carbon 9 อะตอม quaternary carbon 1 อะตอม และ oxygenated tertiary carbon 2 อะตอม [ในจำนวนนี้เป็น glucosyl carbon 6 อะตอม (δ_C 101.8, 78.3, 78.2, 75.3, 71.7 และ 62.8)]

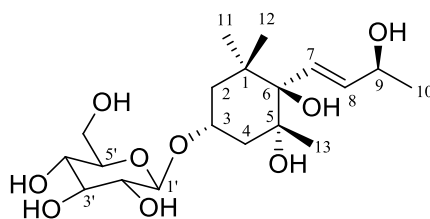
เมื่อตรวจสอบสเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) และ $^{13}\text{C-NMR}$ ดังแสดงในตารางที่ 5 พบสัญญาณทุกตำแหน่งมีรูปแบบใกล้เคียงกับของสารประกอบ **EH 4** ยกเว้นที่ C-3 โดยสามารถระบุยืนยันตำแหน่งการเชื่อมต่อของหมู่ glucopyranosyl กับ oxymethine carbon C-3 จาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-1' [δ_H 4.41 (d, $J = 8.0$ Hz)]/C-3 (δ_C 75.5), C-2' (δ_C 75.3), C-3' (δ_C 78.3)

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 5** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR spectra ดังแสดงในตารางที่ 5

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบว่าสารประกอบ **EH 5** มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับสารประกอบ **EH 4**

จากรูปแบบ proton coupling constant ของ H-3 ที่ δ_H 4.17 ที่ปรากฏสัญญาณเป็น quint-like ด้วยค่า $J = 3.5$ Hz ที่บ่งชี้ว่าตำแหน่ง H-3 มี orientation เป็น β และการเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 5**; $[\alpha]_D^{23}$ -14.22 (c 0.22, MeOH) กับของสารประกอบ **EH 4**; $[\alpha]_D^{31}$ -14.27 (c 1.24, MeOH) และสารประกอบ **EH 3**; $[\alpha]_D^{31}$ -26.84 (c 0.19, MeOH) พบเป็นค่า negative เหมือนกัน นั่นแสดงว่าสารประกอบ **EH 5** มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีส่วน side chain เหมือนกับสารประกอบ **EH 4** และ **EH 3** แต่ต่างกันที่ตำแหน่ง C-3 ของโครงสร้างหลักเท่านั้น

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 5** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*R*, 5*R*, 6*R*, 7*E*, 9*S*) ดังนั้นสารประกอบ **EH 5** จึงเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน และให้ชื่อว่า (3*R*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 5**

ตารางที่ 5 ค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 5

Position	สารประกอบ EH 5 (CD_3OD)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	38.6, C	-
2	1.90 dd (14.4, 3.5) ^a 1.66 dd (14.4, 3.5)	42.1, CH_2	C-1, 3, 4, 6, 11, 12
3	4.17 quint-like (3.5)	75.5, CH	C-1, 2, 4, 5
4	1.94 br s ^a	37.7, CH_2	C-2, 3, 5, 6, 13
5	-	76.4, C	-
6	-	80.1, C	-
7	6.16 d (15.9)	131.2, CH	C-6, 9
8	5.78 dd (15.9, 6.3)	135.7, CH	C-6, 9, 10
9	4.34 quint (6.3)	69.5, CH	C-7, 8, 10
10	1.26 d (6.3)	24.1, CH_3	C-8, 9
11	1.27 s	28.1, CH_3	C-1, 2, 6, 12
12	0.88 s	28.0, CH_3	C-1, 2, 6, 11
13	1.10 s	26.8, CH_3	C-4, 5, 6
1'	4.41 d, (8.0)	101.8, CH	C-3, 2', 3'
2'	3.16 t (8.4)	75.3, CH	C-1', 3'
3'	3.37 t (8.9)	78.3, CH	C-1', 2', 4', 5'
4'	3.30 ^b	71.7, CH	C-3', 5', 6'
5'	3.28 ^b	78.2, CH	C-3', 6'
6'	3.86 d (11.7) 3.66 dd (11.7, 4.7)	62.8, CH_2	C-4', 5'

^{a, b} Overlapped signals.

4.7 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 6

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 6

สารประกอบ EH 6 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 1.7 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.15/28 (13.36 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 7

โดยเมื่อนำ Fr. 15/28 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH_2Cl_2 จนถึง CH_2Cl_2 -MeOH (30:70) ได้สารทั้งหมด 10 ส่วนย่อย (Fr. 1-10/35) นำ Fr. 7/35 (8.42 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (98:2-90:10) ได้สารทั้งหมด 9 ส่วนย่อย (Fr. 1-9/101) จากนั้นนำ Fr. 8/101 (2.78 กรัม) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/115) นำ Fr. 3/115 (1.10 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (70:30-30:70) ได้สารทั้งหมด 15 ส่วนย่อย (Fr. 1-15/174) จากนั้นนำ Fr. 9-10/174 (36.9 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (75:25-65:35) ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/188) เมื่อนำ Fr. 1-2/188 (1.7 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 6

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 6

สารประกอบ EH 6 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 1.7 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3418 cm^{-1} (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2927 และ 2860 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1715 และ 1675 cm^{-1} (C=O stretching) ของหมู่ carbonyl ที่ ν_{max} 1459, 1427, และ 1365 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene และ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1259, 1179 และ 1049 cm^{-1} (C-O stretching) ของ alcohol ที่ ν_{max} 988 และ 913 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z (277.1198) $[\text{M}+\text{Cl}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{ClO}_4$, 277.1201) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 6 คือ $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_4$

^{13}C -NMR spectrum ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 13 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อพิจารณาร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 4 อะตอม methylene carbon 2 อะตอม methine carbon 3 อะตอม quaternary carbon 1 อะตอม oxygenated tertiary carbon 2 อะตอม และ carbonyl carbon 1 อะตอม (δ_{C} 197.4)

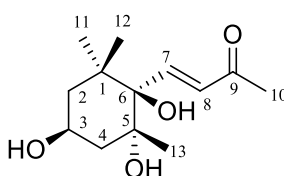
เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ **EH 6** กับ **EH 3** พบว่ามีลักษณะสัญญาณคล้ายกัน ยกเว้นไม่ปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 4.35 (quint, $J = 6.0$ Hz) ที่พบในแบบของสารประกอบ **EH 3** แต่มีการปรากฏของสัญญาณคาร์บอนที่ δ_{C} 197.4 ของหมู่ carbonyl ที่ C-9 และสัญญาณ singlet ที่ δ_{H} 2.26 (H_3 -10) ยืนยันได้จากข้อมูล HSQC และ HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-7 [δ_{H} 7.00 (d, $J = 15.6$ Hz)]/C-6 (δ_{C} 69.4), C-8 (δ_{C} 132.5), C-9 (δ_{C} 197.4); H-8 [δ_{H} 6.26 (d, $J = 15.6$ Hz)]/C-6, C-7 (δ_{C} 142.3), C-9, C-10 (δ_{C} 28.3) และ H-10 [δ_{H} 2.26 (s)]/C-8, C-9 ซึ่งบ่งชี้ว่าตำแหน่งของ carbonyl group ที่ C-9 มีผลทำให้ค่า chemical shift ที่ δ_{H} 7.00 (d, $J = 15.6$ Hz, H-7) และ 6.26 (d, $J = 15.6$ Hz, H-8) เกิดสัญญาณ down fields

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 6** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (Park et al., 2011) ซึ่งพบว่ามีค่าคล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 6

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบว่าสารประกอบ **EH 6** มีโครงสร้างทางเคมีที่มี planar structure ในส่วนโครงสร้างหลักเหมือนกับสารประกอบ **EH 3** แต่ต่างกันที่มี carbonyl group อยู่ที่ตำแหน่ง C-9

เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 6**; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -20.00$ (c 0.17, MeOH) และของสารประกอบ **EH 3**; $[\alpha]_{\text{D}}^{31} -26.84$ (c 0.19, MeOH) ซึ่งมีโครงสร้างหลักแบบเดียวกัน พบเป็นค่า negative เหมือนกัน นั่นแสดงว่าสารประกอบ **EH 6** มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*) เหมือนกับสารประกอบ **EH 3**

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 6** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*) และมีชื่อว่า (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-ene-9-oxo-megastigmane ที่ตรงกับสารประกอบ (*E*)-4-(*r*-1',*t*-2',*c*-4'-trihydroxy-2',6',6'-trimethylcyclohexyl)but-3-en-2-one (Tan, Wilkins, and Holland, 1989; Zhang et al., 2010) ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจาก New Zealand thyme honey (Tan, et al., 1989) และจากต้น *Gynostemma pentaphyllum* (Zhang et al., 2010)



สูตร โครงสร้างของสารประกอบ **EH 6**

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

(3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one กับสารประกอบ **EH 6**

และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ **EH 6**

Position	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>E</i>)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one*		สารประกอบ EH 6 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	36.1, C	-	35.1, C	-
2	1.57 dd (12.8, 3.6) 1.26 dd (12.8, 10.8)	47.6, CH ₂	1.60 dd (12.8, 2.2) 1.22 dd (12.8, 5.9)	46.6, CH ₂	C-1, 3, 4, 11, 12
3	3.75 m	64.3, CH	3.89 dddd (13.8, 5.1, 3.5, 1.6)	64.0, CH	
4	2.31 dd (14.4, 5.2) 1.65 dd (14.4, 9.2)	41.3, CH ₂	2.36 ddd (14.4, 5.1, 1.6) 1.63 dd (14.4, 8.6)	40.5, CH ₂	C-2, 3, 6, 13
5	-	68.7, C	-	67.2, C	-
6	-	70.8, C	-	69.4, C	-
7	7.16 d (15.6)	145.2, CH	7.00 d (15.6)	142.3, CH	C-6, 8, 9
8	6.17 d (15.6)	133.6, CH	6.26 d (15.6)	132.5, CH	C-6, 7, 9, 10
9	-	199.9, C	-	197.4, C	-
10	2.28 s	27.4, CH ₃	2.26 s	28.3, CH ₃	C-7, 8, 9
11	0.95 s	25.1, CH ₃	1.17 s ^{a, b}	29.3, CH ₃ ^c	C-1, 2, 6, 12
12	1.18 s	29.7, CH ₃	0.95 s ^a	24.9, CH ₃ ^c	C-1, 2, 3, 6, 11
13	1.17 s	20.0, CH ₃	1.17 s ^b	19.8, CH ₃	C-4, 5, 6

^{a, c} Interchangeable signals.

^b Overlapped signals.

*(Park et al., 2011)

สารประกอบ **EH 6** และสารประกอบ (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one มีรูปแบบสเตอริโอเคมีต่างกันเฉพาะที่ตำแหน่ง C-6 โดยสารประกอบ **EH 6** มี absolute configuration เป็น (6*R*)

4.8 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 7

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 7

สารประกอบ EH 7 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 2.4 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.16-17/28 (3.26 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 9

โดยเมื่อนำ Fr.16-17/28 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (70:30-20:80) ได้สารทั้งหมด 18 ส่วนย่อย (Fr. 1-18/7) จากนั้นนำ Fr. 16/7 (161.1 มิลลิกรัม), Fr. 17/7 (52.8 มิลลิกรัม) และ Fr. 18/7 (240.1 มิลลิกรัม) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/14), 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/10) และ 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/16) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำ Fr. 2-3/14, 2-3/10 และ 2-3/16 รวมกัน (281.6 มิลลิกรัม) แล้วแยกซ้ำ 3 ครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (96:4) ได้สารทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (Fr. 1-8/40) นำ Fr. 6-7/40 (124.3 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (65:35-55:45) ได้สารทั้งหมด 11 ส่วนย่อย (Fr. 1-11/44) นำ Fr. 8-11/44 (51.1 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยตัวพาระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (98:2-97:3) ได้สารทั้งหมด 9 ส่วนย่อย (Fr. 1-9/63) ตามลำดับ เมื่อนำ Fr. 7/63 (2.4 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 7

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 7

สารประกอบ EH 7 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 2.4 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3382 cm^{-1} (br, O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2969, 2928 และ 2877 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1701 cm^{-1} (C=O stretching) ของหมู่ carbonyl ที่ ν_{max} 1659 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{max} 1454, 1380, 1299 และ 1245 cm^{-1} (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1174, 1144, 1041 และ 1008 cm^{-1} (C-O stretching) ของ alcohol และ ether ที่ ν_{max} 980, 943, 887, 846, 801 และ 765 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 263.1257 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Na}$, 263.1254) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 7 คือ $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_4$

^{13}C -NMR spectrum ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 13 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl

carbon 3 อะตอม methylene carbon 3 อะตอม methine carbon 3 อะตอม quaternary carbon 1 อะตอม oxygenated tertiary carbon 2 อะตอม และ carbonyl carbon 1 อะตอม (δ_C 209.7)

เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ **EH 7** กับ **EH 1** พบมีสัญญาณคล้ายกันที่ δ_H 4.46 (quint, $J = 6.3$ Hz) ของ H-9, 2.75 (d, $J = 16.9$ Hz) และ 2.37 (d, $J = 16.9$ Hz) ของ H₂-2, 1.32 (d, $J = 6.4$ Hz) ของ H₃-10 และ 0.90 (s) ของ H₃-12 ยกเว้นที่ δ_H 5.94 (dd, $J = 15.9, 5.0$ Hz) กำหนดเป็นของ H-8, 5.88 (d, $J = 15.9$ Hz) ของ H-7, δ_H 3.78 (d, $J = 8.9$ Hz) และ 3.73 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz) ของ H₂-11 ที่ค่า δ_H 2.75 (d, $J = 17.1$ Hz), 2.21 (d, $J = 15.9$ Hz) และ δ_H 1.07 (s) ปรากฏสัญญาณ high field เมื่อเทียบกับสัญญาณโปรตอนของสารประกอบ **EH 1** จึงระบุเป็นของ H₂-4 และ H₃-13 ตามลำดับ โดยยืนยันได้จาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-7/ C-1 (δ_C 45.7), C-5 (δ_C 83.7), C-6 (δ_C 80.5), C-8 (δ_C 134.9), C-9 (δ_C 68.3); H-8/C-6, C-7(δ_C 128.7), C-9, C-10 (δ_C 23.9); H-11/ C-1, C-2 (δ_C 50.9), C-5, C-6, C-12 (δ_C 17.9); H-4/C-2, C-3 (δ_C 209.7), C-5, C-6, C-13 (δ_C 21.4) และ H-13/C-3, C-4 (δ_C 50.6), C-5, C-6

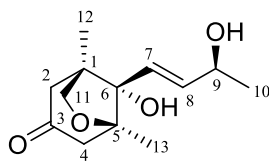
การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 7** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ drummondol (Powell and Smith, 1981) ซึ่งมีค่าคล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 7

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบว่าสารประกอบ **EH 7** มีโครงสร้างทางเคมีที่มี planar structure เหมือนกับสารประกอบ drummondol (Powell and Smith, 1981)

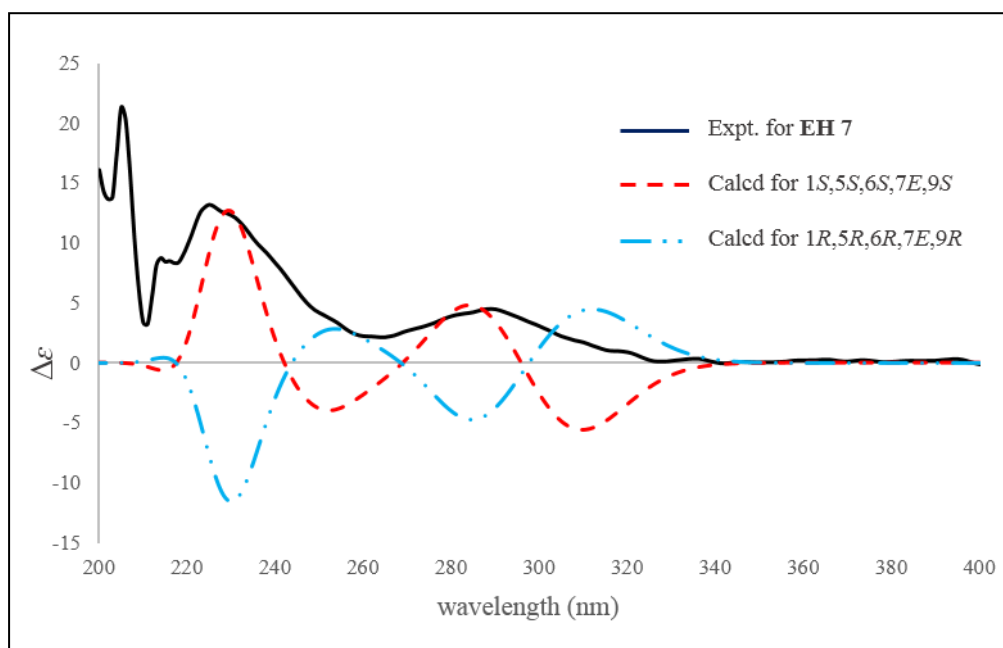
เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 7**; $[\alpha]_D^{23} +15.37$ (c 0.24, MeOH) ซึ่งเป็นค่า positive และของสารประกอบ drummondol ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ $[\alpha]_D^{23} -21$ (c 1.03, MeOH) เป็นค่า negative และรายงานสเตอริโอเคมี absolute configuration ที่ตำแหน่ง C-1, C-5 และ C-6 เป็น (1*R*, 5*R*, 6*S*) (Powell and Smith, 1981) พบว่ามีความไม่สอดคล้องกัน นั้นแสดงว่าสารประกอบ **EH 7** กับ drummondol มีสเตอริโอเคมีในรูปแบบที่ต่างกัน

ทั้งนี้ สามารถพิสูจน์โครงสร้างสเตอริโอเคมี ได้จากการเปรียบเทียบ Experimental ECD ของสารประกอบ **EH 7** ซึ่งแสดง positive cotton effect ($\Delta\epsilon_{225} +13.17$ และ $\Delta\epsilon_{289} +4.48$) กับ Calculated ECD ดังแสดงในภาพประกอบ 18 พบว่าสารประกอบ **EH 7** มีสเตอริโอเคมีสอดคล้องกับรูปแบบ (1*S*, 5*S*, 6*S*, 7*E*, 9*S*)

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 7** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (1*S*, 5*S*, 6*S*, 7*E*, 9*S*) ดังนั้นสารประกอบ **EH 7** จึงเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน และให้ชื่อว่า (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol



สูตร โครงสร้างของสารประกอบ EH 7



ภาพประกอบ 18 การเปรียบเทียบ Experimental ECD กับ Calculated ECD ของสารประกอบ EH 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ drummondol
กับสารประกอบ EH 7 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 7

Position	drummondol*		สารประกอบ EH 7 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	47.7, C	-	45.7, C	-
2	2.60 dd (18, 2) 2.35 d (18)	52.6, CH ₂	2.75 d (16.9) ^a 2.37 d (16.9)	50.9, CH ₂	C-1, 3, 4, 6, 11, 12
3	-	206.9, C	-	209.7, C	-
4	2.61 s	53.1, CH ₂	2.75 d (17.1) ^a 2.21 d (15.9)	50.6, CH ₂	C-2, 3, 5, 6, 13
5	-	81.9, C	-	83.7, C	-
6	-	85.7, C	-	80.5, C	-
7	5.86 dd (15, 1)	124.1, CH	5.88 d (15.9)	128.7, CH	C-1, 5, 6, 8, 9
8	6.20 dd (15, 6)	140.0, CH	5.94 dd (15.9, 5.0)	134.9, CH	C-6, 7, 9, 10
9	4.45 m (6, 1)	68.0, CH	4.46 quint (6.3)	68.3, CH	C-7, 8, 10
10	1.33 d (6)	24.2, CH ₃	1.32 d (6.4)	23.9, CH ₃	C- 8, 9
11	3.88 dd (8, 2) 3.72 d (8)	77.3, CH ₂	3.78 d (8.9) 3.73 dd (8.9 2.6)	76.4, CH ₂	C-1, 2, 5, 6, 12
12	1.00 s	15.4, CH ₃	0.90 s	17.9, CH ₃	C-1, 2, 3, 6, 11
13	1.20 s	18.9, CH ₃	1.07 s	21.4, CH ₃	C-3, 4, 5, 6

^aOverlapped signals.

*(Powell and Smith, 1981)

4.9 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 8

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 8

สารประกอบ EH 8 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 9.1 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr. 12-14/7 (16.59 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 11

โดยเมื่อนำ Fr. 12-14/7 มาแยกด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวพาระบบ 100% MeOH ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/57) นำ Fr. 2/57 (6.75 กรัม) มาแยกด้วย reversed phase silica gel RP-18 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ MeOH-H₂O (10:90) จนถึง 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (Fr. 1-5/58) จากนั้นนำ Fr. 2/58 (3.75 กรัม) มาแยกต่อด้วย sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวพาระบบ แยกสารได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (Fr. 1-8/59) นำ Fr. 3-4/59 (1.23 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH₂Cl₂-MeOH (92:8-90:10) แยกสารได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (Fr. 1-8 /63) จากนั้นนำ Fr.3/63 (82.2 มิลลิกรัม) มาแยกซ้ำโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี [silica gel, CH₂Cl₂-MeOH (92:8)] แยกสารได้ทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/68) เมื่อนำ Fr.3/68 (9.1 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 8

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 8

สารประกอบ EH 8 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 9.1 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ V_{\max} 3352 cm⁻¹ (br, O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ V_{\max} 2972, 2929 และ 2879 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ V_{\max} 1699 cm⁻¹ (C=O stretching) ของหมู่ carbonyl ที่ V_{\max} 1649 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ V_{\max} 1452 และ 1376 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ V_{\max} 1306, 1247, 1153, 1071, 1028 และ 1010 cm⁻¹ (C-O stretching) ของ alcohol และ ether ที่ V_{\max} 927, 890 และ 847 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 425.1822 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₃₀O₉Na, 425.1779) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 8 คือ C₁₉H₃₀O₉,

¹³C-NMR spectrum ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 19 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาพร้อมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 3 อะตอม methylene carbon 4 อะตอม methine carbon 8 อะตอม quaternary carbon

1 อะตอม oxygenated tertiary carbon 2 อะตอม และ carbonyl carbon 1 อะตอม (δ_C 213.1) [ในจำนวนนี้เป็น glucosyl carbon 6 อะตอม (δ_C 102.8, 78.2, 78.1, 75.3, 71.7 และ 62.9)]

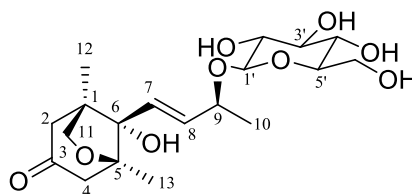
เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ **EH 8** กับ **EH 7** พบมีลักษณะสัญญาณคล้ายกัน ยกเว้นมีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณในช่วง δ_H 3.18-4.34 ซึ่งเป็นลักษณะสัญญาณโปรตอนของหมู่ glucosyl ที่เกาะที่ตำแหน่ง C-9 โดยยืนยันได้จาก HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-1' [δ_H 4.34 (d, $J = 7.8$ Hz)]/C-9 (δ_C 78.0)

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 8** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ spionoside B (Calis et al., 2002) ซึ่งมีค่าคล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 8

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบได้ว่าสารประกอบ **EH 8** มีโครงสร้างทางเคมีที่มี planar structure เหมือนกับสารประกอบ spionoside B (Calis et al., 2002)

เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 8**; $[\alpha]_D^{23} +4.08$ (c 0.91, MeOH) ซึ่งเป็นค่า positive และของสารประกอบ spionoside B ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ $[\alpha]_D^{20} -51.2$ (c 2.0, MeOH) เป็นค่า negative และรายงานสเตอริโอเคมีเป็น (1*R*, 5*R*, 6*S*, 7*E*, 9*S*) (Calis et al., 2002) พบว่ามีความไม่สอดคล้องกัน แต่มีความสอดคล้องกับของสารประกอบ **EH 7**; $[\alpha]_D^{23} +15.37$ (c 0.24, MeOH) ดังนั้นจึงสรุปว่าสารประกอบ **EH 8** มีสเตอริโอเคมีเป็น (1*S*, 5*S*, 6*S*, 7*E*, 9*S*) เหมือนกับสารประกอบ **EH 7**

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 8** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม megastigmane ที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีเป็น (1*S*, 5*S*, 6*S*, 7*E*, 9*S*) ดังนั้นสารประกอบ **EH 8** จึงเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน และให้ชื่อว่า (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol-9-*O*- β -D-glucopyranoside



สูตร โครงสร้างของสารประกอบ **EH 8**

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ spionoside B กับสารประกอบ EH 8 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 8

Position	spionoside B (DMSO- d_6)*		สารประกอบ EH 8 (CD $_3$ OD)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	-	48.0, C	-	47.0, C	-
2	2.63 dd (17.7,2.3) 2.21 dd (17.7,2.3)	52.1, CH $_2$	2.77 d (17.1) 2.19 d (17.1)	51.6, CH $_2$	C-1, 4, 5, 6, 11, 12
3	-	209.0, C	-	213.1, C	-
4	2.70 d (17.7) 2.27 dd (17.7,2.3)	53.2, CH $_2$	2.74 d (17.3) 2.25 d (17.3)	52.1, CH $_2$	C- 3, 5, 6,11, 13
5	-	86.1, C	-	85.4, C	-
6	-	81.1, C	-	81.3, C	-
7	6.21 d (15.5)	128.0, CH	5.89 d (15.7)	130.7, CH	C-6, 8, 9
8	5.88 dd (15.5, 6.4)	135.3, CH	6.05 dd (15.7, 6.4)	135.2, CH	C-6, 7, 9, 10
9	4.48 dq (6.4, 6.5)	72.3, CH	4.48 quint (6.4)	78.0, CH	C-7, 8, 10, 1'
10	1.20 d (6.5)	22.5, CH $_3$	1.34 d (6.4)	21.6, CH $_3$	C-8, 9
11	3.72 dd (7.5, 2.3) 3.48 d (7.5)	76.8, CH $_2$	3.80 dd (8.9, 2.6) 3.73 d (8.9)	77.6, CH $_2$	C-1, 2, 5, 6, 12
12	0.82 s	15.5, CH $_3$	0.96 s	18.3, CH $_3$	C-1, 2, 6, 11
13	1.05 s	19.4, CH $_3$	1.06 s	21.9, CH $_3$	C-4, 5, 6
1'	4.12 d (7.3)	100.0, CH	4.34 d (7.8)	102.8, CH	C-9
2'	2.95 ^a	73.5, CH	3.18 t (7.8)	75.3, CH	C-1', 3', 6'
3'	3.05 t (9.0)	77.0, CH	3.23 ^b	78.1, CH	C-2', 4'
4'	2.99 t (9.0)	70.4, CH	3.23 ^b	71.7, CH	C-3', 5'
5'	2.97 ^a	77.3, CH	3.33 ^c	78.2, CH	C-3'
6'	3.63 ^a 3.38 dd (11.8, 5.0)	61.3, CH $_2$	3.87 d (11.7) 3.63 dd (11.7, 3.0)	62.9, CH $_2$	C-2', 5'

^{a, b} overlapped signals.

^c obscured by the solvent signal.

*(Calis et al., 2002)

4.10 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 9

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 9

สารประกอบ EH 9 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 12.2 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.16-17/28 (3.26 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 8

โดยเมื่อนำ Fr. 16-17/28 มาผ่านการแยกบน silica gel ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสองครั้ง โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (70:30 - 20: 80) ได้สารทั้งหมด 18 ส่วนย่อย (Fr. 1-18/7) นำ Fr. 15/7 (210.3 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (60:40) ได้สารทั้งหมด 12 ส่วนย่อย (Fr. 1-12/13) ตามลำดับ จากนั้นนำ Fr. 5/13 (25.3 มิลลิกรัม) ตกผลึกใหม่ด้วยระบบ CH_2Cl_2 -MeOH (6:4) แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 9

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 9

สารประกอบ EH 9 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 12.2 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 214-216 °C [lit. mp = 220-222 °C] (Li et al., 1990)

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3329, 3232 cm^{-1} (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2931 และ 2867 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1449, 1384, 1363, 1258 และ 1148 cm^{-1} (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1092, 1071, 1045 และ 1025 cm^{-1} (C-O stretching) ของหมู่ hydroxyl

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 345.2402 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{Na}$, 345.2397) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 9 คือ $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$

^{13}C -NMR spectrum ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 20 อะตอม เมื่อพิจารณา ร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 3 อะตอม methylene carbon 9 อะตอม methine carbon 4 อะตอม quaternary carbon 3 อะตอม และ oxygenated tertiary carbon 1 อะตอม (δ_{C} 81.5)

สารประกอบ EH 9 แสดงลักษณะสัญญาณของ ^1H และ ^{13}C -NMR spectrum คล้ายกับ โครงสร้างหลักของสารกลุ่ม *ent*-kaurane diterpenoid ดังแสดงในตารางที่ 9 จากข้อมูล ^1H -NMR resonances ปรากฏสัญญาณของ oxymethylene proton ที่ δ_{H} 3.69 (d, $J = 11.0$ Hz) และ 3.58 (d, $J = 11.0$ Hz) รวมทั้งสัญญาณ high field ของ oxymethine proton ที่ δ_{H} 3.13 (dd, $J = 10.7, 5.6$ Hz) และ สัญญาณของ 3 methyl protons แบบ singlet ที่ δ_{H} 0.96, 0.91 และ 0.71 นอกจากนี้ ^{13}C -NMR

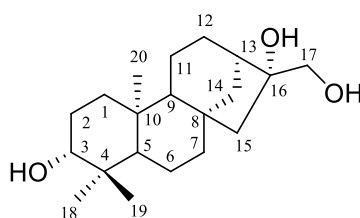
spectrum ยังปรากฏสัญญาณของ oxymethylene carbon ที่ δ_C 65.9, oxymethine carbon ที่ δ_C 78.8 และ oxygenated tertiary carbon ที่ δ_C 81.5

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ ^{13}C -NMR ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 9** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol (Li et al., 1990) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 9

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ทราบว่าสารประกอบ **EH 9** มีโครงสร้างทางเคมีที่มี planar structure เหมือนกับสารประกอบ *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol (Dou et al., 2010; Li et al., 1990; Qiu et al., 2008; Wu et al., 1995)

เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารประกอบ **EH 9**; $[\alpha]_D^{31}$ -14.77 (*c* 0.09, MeOH) และของสารประกอบ *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol ที่มีรายงานค่าไว้เท่ากับ $[\alpha]_D^{28}$ -38.89 (*c* 0.36, pyridine) (Li et al., 1990) พบเป็นค่า negative เหมือนกัน นั้นแสดงว่าสารประกอบ **EH 9** ต้องมีสเตอริโอเคมีในรูปแบบที่เหมือนกับสารประกอบ *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 9** เป็นสารอนุพันธ์กลุ่ม *ent*-kaurane ซึ่งเป็นสารประเภท diterpene ที่มีชื่อว่า *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Artemisia sacrorum* (Li et al., 1990) และ *Smallantus sonchifolius* (Dou et al., 2010)



สูตร โครงสร้างของสารประกอบ **EH 9**

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

ent-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol กับสารประกอบ **EH 9** และข้อมูล HMBC ของ

สารประกอบ **EH 9**

Position	<i>ent</i> -kaurane-3 β ,16 β ,17-triol*		สารประกอบ EH 9 (CDCl ₃ + 2 drops CD ₃ OD)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	1.64 dt (13.0, 5.0) 0.77 dt (13.0, 5.0)	39.1, CH ₂	1.75 dt (13.2, 3.5) 0.82 dddd (12.2, 11.3, 6.8, 5.5)	38.4, CH ₂	C-3, 5, 20
2	1.76 m 1.60 m	28.3, CH ₂	1.59 m	26.9, CH ₂	C-4, 10
3	3.31 dt (11.0, 5.5)	78.2, CH	3.13 dd (10.7, 5.6)	78.8, CH	C-1, 18, 19
4	-	39.5, C ^a	-	38.6, C	-
5	0.66 dd (12.0, 2.0)	55.5, CH	0.69 dd (11.7, 1.8)	54.8, CH	C-1, 4, 10, 20
6	1.42 m 1.26 m	20.7, CH ₂	1.52 m 1.32 m	20.0, CH ₂	-
7	1.60 m 1.42 m	42.7, CH ₂	1.59 m 1.42 m	41.7, CH ₂	C-14
8	-	44.8, C	-	44.3, C	-
9	0.86 d (8.2)	57.1, CH	0.91 ^b	56.3, CH	C-1, 5, 10, 15
10	-	39.5, C ^a	-	38.9, C	-
11	1.46 m	18.9, CH ₂	1.48 m	18.2, CH ₂	
12	1.76 m 1.48 m	26.9, CH ₂	1.49 m	26.0, CH ₂	
13	2.35 m	46.1, CH	1.98 br s	45.1, CH	
14	1.92 dd (12.0, 4.0) 1.86 d (12)	37.8, CH ₂	1.87 br d (11.6) 1.51 d (10.1)	37.0, CH ₂	C-15, 16
15	1.76 m 1.58 m	54.0, CH ₂	1.49 m 1.38 m	52.6, CH ₂	C-7, 9, 16
16	-	81.7, C	-	81.5, C	-
17	4.22 dd (10.5, 4.5) 3.94 dd (10.5, 4.5)	66.6, CH ₂	3.69 d (11.0) 3.58 d (11.0)	65.9, CH ₂	C-13, 16
18	1.08 s	29.0, CH ₃	0.91 s ^b	28.1, CH ₃	C-3, 4, 5, 19
19	0.91 s	18.2, CH ₃	0.71 s	15.3, CH ₃	C-3, 4, 5, 18
20	0.91 s	16.4, CH ₃	0.96 s	17.6, CH ₃	C-4, 5, 9, 10

^{a, b} Overlapped signals.

*(Li et al., 1990)

4.11 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 10

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 10

สารประกอบ EH 10 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 6.8 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr. 19/7 (15.23 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 12

โดยเมื่อนำ Fr. 19/7 (15.23 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH₂Cl₂ จนถึง CH₂Cl₂-MeOH (80:20) ได้สารทั้งหมด 12 ส่วนย่อย (Fr. 1-12/35) จากนั้นนำ Fr. 9/35 (222.6 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel อีก 4 ครั้ง โดยใช้ตัวพาระบบของ Hexane-CH₂Cl₂ (30:70) จนถึง 100% CH₂Cl₂ ได้สารทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (Fr. 1-8/43) จากนั้นนำ Fr. 7-8/43 (118.7 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (85:15-70:30) ได้สารทั้งหมด 6 ส่วนย่อย (Fr. 1-6/49) นำ Fr. 3-4/49 (59.5 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยตัวพาระบบ Hexane-CH₂Cl₂ (30:70) จนถึง CH₂Cl₂-MeOH (90:10) ได้สารทั้งหมด 6 ส่วนย่อย (Fr. 1-6/50) นำ Fr. 2-4/50 (19.5 มิลลิกรัม) มาแยกซ้ำด้วยตัวพาระบบ CH₂Cl₂-MeOH (99.8:0.2-90:10) ได้สารทั้งหมด 7 ส่วนย่อย (Fr. 1-7/54) เมื่อนำ Fr. 3/54 (6.8 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 10

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 10

สารประกอบ EH 10 ลักษณะของเหลวหนืดไม่มีสี น้ำหนัก 6.8 มิลลิกรัม

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{\max} 3422 cm⁻¹ (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 2952, 2925 และ 2867 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1733, 1722 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{\max} 1461, 1378, 1263 และ 1168 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1090 และ 1057 cm⁻¹ (C-O stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 953, 905 และ 736 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

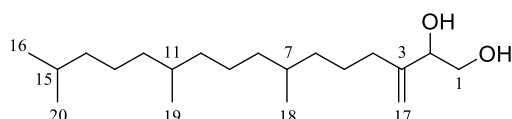
Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 335.2918 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₀H₄₀O₂Na, 335.2916) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 10 คือ C₂₀H₄₀O₂

¹³C-NMR spectrum แสดงสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 20 อะตอม เมื่อพิจารณาร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 4 อะตอม methylene carbon 11 อะตอม methine carbon 4 อะตอม และ quaternary carbon 1 อะตอม (โดยเป็น oxymethylene carbon 1 อะตอม และ oxymethine carbon 1 อะตอม)

สารประกอบ **EH 10** ให้สัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ resonances ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยปรากฏค่าสัญญาณของ methyl proton ของ $\text{CH}_3\text{-CH}$ ที่ δ_{H} 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz), 0.83 (d, $J = 6.0$ Hz) และ 0.82 (d, $J = 6.4$ Hz) สัญญาณของ oxymethine proton ที่ δ_{H} 4.18 (dd, $J = 7.1, 3.2$ Hz) สัญญาณของ oxymethylene proton ที่ δ_{H} 3.68 (dd, $J = 11.2, 3.2$ Hz) และ 3.51 (dd, $J = 11.2, 7.2$ Hz) สัญญาณ broad singlet ของ terminal methylene proton ที่ δ_{H} 4.95 และ 5.11 โดยมีข้อมูล HMBC spectrum ที่แสดง cross-peaks ระหว่าง H-17 (δ_{H} 4.95, 5.11)/C-1 (δ_{C} 65.6), C-2 (δ_{C} 74.9), C-3 (δ_{C} 148.6), C-4 (δ_{C} 32.9); H-16 (δ_{H} 0.84)/C-14 (δ_{C} 39.3), C-15 (δ_{C} 27.9), C-20 (δ_{C} 22.7); H-18 (δ_{H} 0.83)/C-6 (δ_{C} 36.7), C-7 (δ_{C} 32.6), C-8 (δ_{C} 37.4) และ H-19 (δ_{H} 0.82)/C-10 (δ_{C} 37.2), C-11 (δ_{C} 32.7), C-12 (δ_{C} 36.8)

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 10** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR spectra ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol (Urones et al., 1987) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 10

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 10** คือ 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol ซึ่งเป็นสารประเภท diterpene ที่มีหมู่ diol และ terminal olefin และเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Senecio gallicus* (Urones et al., 1987) และ *Eupatorium fortunei* (Jiang et al., 2006)



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 10**

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

7,11,15- trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol กับสารประกอบ EH 10

และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 10

Position	7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol*		สารประกอบ EH 10 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1	3.69 dd (11.23, 3.42) 3.57 dd (11.23, 7.32)	65.75, CH ₂	3.68 dd (11.2, 3.2) 3.51 dd (11.2, 7.2)	65.6, CH ₂	C-2, 3
2	4.21 dd (11.23, 3.42)	75.12, CH	4.18 dd (7.1, 3.2)	74.9, CH	C-1, 3, 4, 17
3		148.86, C		148.6, C	-
4		33.07, CH ₂		32.9, CH ₂	C-2, 3, 17
5		25.64, CH ₂		25.4, CH ₂	
6		36.89, CH ₂		36.7, CH ₂	
7		32.77, CH		32.6, CH	
8		37.50, CH ₂		37.4, CH ₂	
9		24.52, CH ₂		24.4, CH ₂	
10		37.48, CH ₂		37.2, CH ₂	
11		32.86, CH		32.7, CH	
12		37.36, CH ₂		36.8, CH ₂	
13		24.82, CH ₂		24.7, CH ₂	
14		39.45, CH ₂		39.3, CH ₂	C-15, 16, 20
15		28.02, CH		27.9, CH	C-4, 16, 20
16	0.86 d (6.59)	22.63, CH ₃	0.84 d (6.6) ^a	22.6, CH ₃	C-14, 15, 20
17	5.13 s 4.98 s	110.61, CH ₂	5.11 br s 4.95 br s	110.5, CH ₂	C-1, 2, 3, 4
18	0.85 d (6.35)	19.77, CH ₃	0.83 d (6.0)	19.7, CH ₃	C-6, 7, 8
19	0.84 d (6.35)	19.73, CH ₃	0.82 d (6.4)	19.6, CH ₃	C-10, 11, 12
20	0.86 d (6.59)	22.72, CH ₃	0.84 d (6.6) ^a	22.7, CH ₃	C-14, 15, 16

^aOverlapped signals.

*(Urones et al., 1987)

4.12 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 11

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 11

สารประกอบ EH 11 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 6.4 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.9/28 (2.25 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 6

โดยเมื่อนำ Fr. 9/28 (2.25 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane- CH_2Cl_2 (50:50) จนถึง CH_2Cl_2 -MeOH (90:10) ได้สารทั้งหมด 21 ส่วนย่อย (Fr. 1-21/9) นำ Fr. 10-11/9 (64.7 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (98:2-95:5) แยกสารได้ทั้งหมด 12 ส่วนย่อย (Fr. 1-12/14) เมื่อนำ Fr.10/14 (6.4 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 11

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 11

สารประกอบ EH 11 ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 6.4 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 210-212 °C [lit. mp = 210-212 °C] (El-Seedi, 2005)

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3286 cm^{-1} (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 2917 และ 2848 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1734 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{max} 1471, 1462, 1380, 1260 และ 1161 cm^{-1} (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1059 และ 1031 cm^{-1} (C-O stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{max} 874, 800, 729, 658 และ 623 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

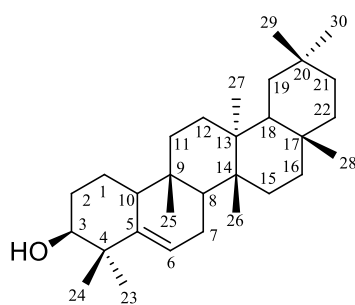
Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 427.3934 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, 427.3927) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 11 คือ $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$

^{13}C -NMR spectrum ใน CDCl_3 ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 30 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 11 เมื่อพิจารณาร่วมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 8 อะตอม methylene carbon 10 อะตอม methine carbon 5 อะตอม (โดยเป็น oxymethine carbon 1 อะตอม) และ quaternary carbon 7 อะตอม

^1H -NMR spectrum ใน CDCl_3 แสดงสัญญาณ singlet ของ methyl proton 8 สัญญาณที่ δ_{H} 1.13, 1.11, 1.06, 1.02, 0.98, 0.96, 0.92 และ 0.83 ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเป็นสารกลุ่ม triterpenoid รวมทั้งมีสัญญาณ broad triplet ของ cabinolic proton ที่ δ_{H} 3.44 ($J = 2.8$ Hz) สัญญาณ broad doublet ของ olefinic proton ที่ δ_{H} 5.61 ($J = 6.0$ Hz) และสัญญาณของ olefinic carbon ที่ δ_{C} 122.1 และ 141.5

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ ^{13}C -NMR ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 11** อาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจาก 2D NMR spectra ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ glut-5-en-3 β -ol (El-Seedi, 2005) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 11

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 11** คือ glut-5-en-3 β -ol ซึ่งเป็นสารประเภท triterpene และเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Artocarpus champeden* (Achmad et al., 1996)



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 11**

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ

glut-5-en-3 β -ol กับสารประกอบ EH 11 และข้อมูล HMBC ของสารประกอบ EH 11

Position	glut-5-en-3 β -ol*		สารประกอบ EH 11 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1		23.56, CH ₂	1.52, 1.47	18.2, CH ₂	
2		18.13, CH ₂	1.85, 1.67	27.8, CH ₂	
3	3.45 t (3.0)	76.17, CH	3.44 br t (2.8)	76.3, CH	C-1, 5
4		39.25, C	-	40.8, C	-
5		141.58, C	-	141.5, C	-
6	5.60 d (5.6)	121.94, CH	5.61 br d (6.0)	122.1, CH	C-4, 7, 8, 10
7		27.74, CH ₂	2.00, 1.86	23.6, CH ₂	
8		42.96, CH	1.50	47.4, CH	
9		34.79, C	-	34.6, C	-
10		49.65, CH	2.09	49.6, CH	-
11		34.56, CH ₂	1.84, 1.67	27.8, CH ₂	
12		30.33, CH ₂	1.33	30.3, CH ₂	
13		37.77, C	-	37.8, C	-
14		40.75, C	-	38.9 C	-
15		32.04, CH ₂	1.47, 1.26	31.9, CH ₂	
16		35.94, CH ₂	1.53, 1.36	36.0, CH ₂	
17		30.04, C	-	30.1, C	-
18		47.40, CH	1.56	43.0, CH	
19		35.06, CH ₂	1.52, 1.36	35.0, CH ₂	
20		28.23, C	-	28.2, C	-
21		33.03, CH ₂	1.46, 1.23	33.1, CH ₂	
22		38.92, CH ₂	1.53, 0.91	38.9, CH ₂	
23	1.10 s	28.91, CH ₃	1.11 s ^a	25.4, CH ₃ ^c	C-3, 4, 5, 24
24	1.05 s	25.44, CH ₃	1.02 s ^a	28.9, CH ₃ ^c	C-3, 4, 5, 6, 23
25	0.85 s	16.17, CH ₃	0.83 s	16.2, CH ₃	C-8, 9, 10
26	1.08 s	18.42, CH ₃	1.06 s	19.6, CH ₃	C-8, 13, 14, 15
27	0.99 s	19.64, CH ₃	0.98 s	18.4, CH ₃	C-12, 13, 14, 18
28	1.16 s	32.36, CH ₃	1.13 s	32.0, CH ₃	C-16, 17, 18, 22
29	0.94 s	34.56, CH ₃	0.92 s ^b	34.5, CH ₃ ^d	C-19, 20, 21, 30
30	0.98 s	32.04, CH ₃	0.96 s ^b	32.4, CH ₃ ^d	C-19, 20, 21, 29

^{a-d}Interchangeable signals.

*(El-Seedi, 2005)

4.13 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 12

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 12

สารประกอบ EH 12 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 2.5 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr. 20-21/7 (14.21 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 13

โดยเมื่อนำ Fr. 20-21/7 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH₂Cl₂ จนถึง CH₂Cl₂-MeOH (88:12) ได้สารทั้งหมด 19 ส่วนย่อย (Fr. 1-19/12) นำ Fr. 15/12 (379.8 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ CH₂Cl₂-MeOH (99:1-96:4) แยกสารได้ทั้งหมด 7 ส่วนย่อย (Fr. 1-7/28) นำ Fr.6/28 (29.7 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายระบบ CH₂Cl₂-MeOH (6:4) แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 12

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 12

สารประกอบ EH 12 ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 2.5 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 245-247 °C [lit. mp = 245-246 °C] (Shi et al., 2008)

FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{\max} 3288 cm⁻¹ (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 2930 และ 2862 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1658 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{\max} 1462, 1438, 1380, 1366, 1323, 1303, 1276, 1161 และ 1114 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1088, 1056 และ 1034 cm⁻¹ (C-O stretching) ของ หมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 965, 931, 862 และ 843 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 453.3703 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₉H₅₀O₂ Na, 453.3696) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 12 คือ C₂₉H₅₀O₂

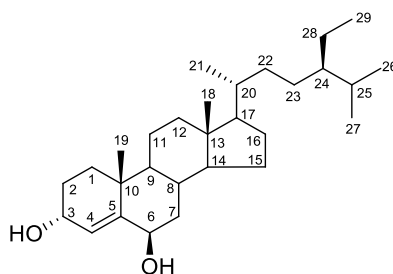
¹³C-NMR spectrum (100 MHz, CDCl₃) ปรากฏเส้นสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 29 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 12 เมื่อพิจารณาพร้อมกับ HSQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ ประกอบด้วย methyl carbon 6 อะตอม methylene carbon 10 อะตอม methine carbon 10 อะตอม (โดยเป็น oxymethine carbon 2 อะตอม) และ quaternary carbon 3 อะตอม

¹H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) ปรากฏค่าสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งมีรูปแบบชุดสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของสาร stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol โดยปรากฏสัญญาณของ 6 methyl proton ที่ δ_{H} 0.61 (s), 1.23 (s), 0.79 (d, J = 7.0 Hz), 0.80 (d, J = 7.2 Hz), 0.84 (t, J = 7.5 Hz) และ 0.90 (d, J = 6.5 Hz) สัญญาณของ 2 oxymethine proton

2 ตำแหน่ง ที่ δ_{H} 4.15 (ddd, $J = 8.0, 6.1, 1.5$ Hz) และ 4.21 (t, $J = 2.7$ Hz) และสัญญาณของ olefinic methine proton ที่ δ_{H} 5.52 (br s)

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ^1H และ ^{13}C -NMR ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 12** อาศัยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol (Shi et al., 2008) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 12

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 12** คือ stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol ซึ่งเป็นสารประเภท sterol และเคยมีรายงานมาก่อนจากต้น *Chaetomorpha basiretorsa* Setchell (Shi et al., 2008)



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 12**

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ
stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol กับสารประกอบ EH 12 และข้อมูล HMBC
ของสารประกอบ EH 12

Position	stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol*		สารประกอบ EH 12 (CDCl ₃)		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	HMBC
1		37.1, CH ₂	1.67 dt (9.4, 4.3), 1.26 m	36.8, CH ₂	C-3, 5, 19
2		29.5, CH ₂	1.92 dt (8.3, 3.0), 1.23 m	29.3, CH ₂	C-10
3	4.25 s	74.5, CH	4.15 ddd (8.0, 6.1, 1.5)	68.0, CH	C-5
4	5.56 br s	128.9, CH	5.52 br s	128.7, CH	C-2, 6, 10
5	-	147.9, C	-	147.7, C	-
6	4.19 br s	68.2, CH	4.21 t (2.7)	74.3, CH	C-4, 8, 10
7		40.1, CH ₂	1.89 dd (12.5, 3.2) 1.12 dd (12.5, 5.9)	39.1, CH ₂	C-5, 6, 9, 14
8		30.5, CH	1.85 dd (11.5, 3.5)	30.2, CH	C-6, 9, 13, 14
9		54.5, CH	0.72 m	54.2, CH	C-7, 8, 12, 19
10	-	37.0, C	-	36.7, C	-
11		21.2, CH ₂	1.43 m, 0.91 ^a	20.9, CH ₂	C-8, 9, 12, 13, 14
12		39.8, CH ₂	1.99 dt (12.6, 3.3)	39.8, CH ₂	C-9, 11, 13, 14
13	-	42.8, C	-	42.6, C	-
14		57.6, CH	1.06 m ^b , 0.95 m ^c	56.1, CH ^d	
15		24.4, CH ₂	1.50-1.58 m	24.2, CH ₂	
16		28.4, CH ₂	1.79 m, 1.23 m	28.2, CH ₂	
17		56.4, CH	1.06 m ^b , 0.95 m ^c	56.1, CH ^d	
18	0.71 s	12.3, CH ₃	0.61 s	12.0, CH ₃	C-12, 13, 14
19	1.54 s	21.7, CH ₃	1.23 s	21.5, CH ₃	C-1, 9, 10
20		36.5, CH	1.33 m	36.1, CH	C-21
21	1.23 s	19.0, CH ₃	0.90 d (6.5) ^a	18.7, CH ₃	C-17, 20, 22
22		34.2 CH ₂	1.30 m, 1.00 m	33.9, CH ₂	
23		26.8 CH ₂	1.31 m, 1.15 m	26.1, CH ₂	
24		46.4, CH	0.91 m ^a	45.8, CH	
25		29.3, CH	1.62 m	29.1, CH	C-23, 24, 28
26	0.80-0.93 m	19.8, CH ₃	0.79 d (7.0)	19.8, CH ₃	C-24, 25, 27
27	0.80-0.93 m	19.2, CH ₃	0.80 d (7.2)	19.0, CH ₃	C-24, 25, 26
28		23.3, CH ₂	1.21 m	23.1, CH ₂	
29	0.80-0.93 m	12.5, CH ₃	0.84 t (7.5)	12.1, CH ₃	C-24, 28

^{a-d}Overlapped signals.

*(Shi et al., 2008)

4.14 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 13

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 13

สารประกอบ EH 13 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 30.2 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr. 20-21/7 (14.21 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 13

โดยเมื่อนำ Fr. 20-21/7 (14.21 กรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH₂Cl₂ จนถึง CH₂Cl₂-MeOH (88:12) ได้สารทั้งหมด 19 ส่วนย่อย (Fr. 1-19/12) นำ Fr.6/12 (41.7 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายระบบ CH₂Cl₂-MeOH (6:4) แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 13

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 13

สารประกอบ EH 13 ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 30.2 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 107-109 °C [lit. mp 104-107 °C] (Suriphon Singha, 2018)

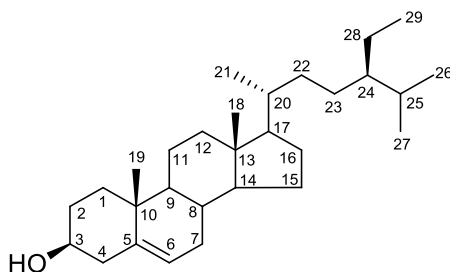
FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{\max} 3416 และ 3277 cm⁻¹ (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 2956, 2934 และ 2866 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1642 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{\max} 1462, 1443, 1377, 1333, 1311, 1240, 1192 และ 1133 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1052 และ 1022 cm⁻¹ (C-O stretching) ของ alcohol ที่ ν_{\max} 956, 925, 838, 801 และ 741 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

¹H-NMR spectrum ใน CDCl₃ แสดงสัญญาณที่ δ_{H} 0.65 (s), 0.79 (d, $J=7.2$ Hz), 0.81 (d, $J=7.0$ Hz), 0.82 (t, $J=7.4$ Hz), 0.89 (d, $J=6.5$ Hz) และ 0.98 (s) ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็น side chain ของสารโครงสร้าง steroid รวมทั้งมีสัญญาณของ cabinolic proton ที่ δ_{H} 3.50 (ddd, $J=15.7, 10.7, 4.6$ Hz) และ olefinic proton ที่ δ_{H} 5.32 (br d, $J=5.2$ Hz)

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ¹H-NMR ของโครงสร้างสารประกอบ EH 13 อาศัยการเปรียบเทียบกับข้อมูล ¹H-NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ β -sitosterol (Suriphon Singha, 2018) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 13

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล spectroscopic และลักษณะทาง TLC ของสารประกอบ EH 13 กับ β -sitosterol ในงานวิจัยที่เคยแยกได้ก่อนหน้านี้ (Suriphon Singha, 2018) พบมีความสอดคล้องกัน

สรุปได้ว่า สารประกอบ EH 13 คือ β -sitosterol ซึ่งเป็นสารประเภท sterol และมีรายงานการค้นพบในพืชหลายชนิด



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 13**

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ β -sitosterol กับสารประกอบ **EH 13**

position	β -sitosterol*	Compound EH 13 (CDCl_3)
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
3	3.51 m	3.50 ddd (15.7, 10.7, 4.6)
6	5.32 br d (5.2)	5.32 br d, (5.2)
18	0.65 s	0.65 s
19	0.98 s	0.98 s
21	0.89 d (6.5)	0.89 d (6.5)
26	0.80 d (7.0)	0.81 d (7.0)
27	0.78 d (6.8)	0.79 d (7.2)
29	0.81 t (7.3)	0.82 t (7.4)

*(Suriphon Singha, 2018)

4.15 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 14

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 14

สารประกอบ EH 14 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 6.1 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr. 19/7 (15.23 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น MeOH (492.50 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 12

โดยเมื่อนำ Fr. 19/7 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ 100% CH₂Cl₂ จนถึง CH₂Cl₂-MeOH (80:20) ได้สารทั้งหมด 12 ส่วนย่อย (Fr. 1-12/35) เมื่อนำ Fr.12/35 (6.1 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 14

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 14

สารประกอบ EH 14 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 6.1 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 273-274 °C [lit. mp = 265-268 °C] (Juthamane Youkwan, 2002)

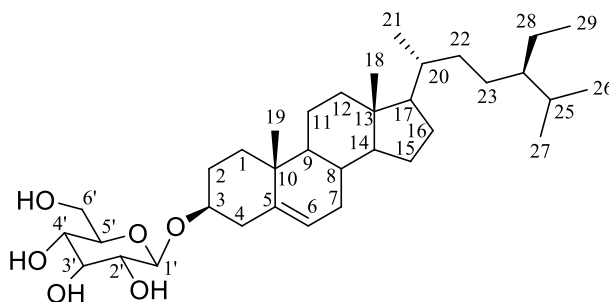
FTIR-spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{\max} 3365 cm⁻¹ (O-H stretching) ของหมู่ hydroxyl ที่ ν_{\max} 2957, 2930, 2868 และ 2850 cm⁻¹ (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1639 และ 1570 cm⁻¹ (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{\max} 1462, 1367, 1255 และ 1164 cm⁻¹ (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{\max} 1104, 1070, 1052 และ 1019 cm⁻¹ (C-O stretching) ของ alcohol ที่ ν_{\max} 960, 926, 800 และ 718 cm⁻¹ (C-H out of plane bending) ของ alkene

เมื่อเปรียบเทียบ ¹H-NMR spectrum ของสารประกอบ EH 14 กับ EH 13 พบมีลักษณะสัญญาณคล้ายกัน ยกเว้นช่วง chemical shift ที่ δ_{H} 3.25 - 4.36 ซึ่งเป็นชุดสัญญาณของ glucosyl group

การกำหนดค่า chemical shift แต่ละตำแหน่งของ ¹H-NMR ของโครงสร้างสารประกอบ EH 14 อาศัยการเปรียบเทียบกับข้อมูล ¹H-NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside (Peshin and Kar, 2017) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 14

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล spectroscopic และลักษณะทาง TLC ของสารประกอบ EH 14 กับสารประกอบ β -sitosteryl glucopyranoside ในงานวิจัยที่เคยแยกได้ก่อนหน้านี้ (Juthamane Youkwan, 2002) พบมีความสอดคล้องกัน

สรุปได้ว่า สารประกอบ EH 14 คือ β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside (หรือ β -sitosteryl glucopyranoside) ซึ่งเป็นสารประเภท sterol และมีรายงานการค้นพบในพืชหลายชนิด



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 14**

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside กับสารประกอบ **EH 14**

position	β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside *	Compound EH 14 (CDCl ₃ +CD ₃ OD)
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
3	2.98 m	3.52 m ^a
6	5.35 t (3.6)	5.31 br d, (3.3)
18	0.70 s	0.62 s
19	0.94 s	0.95 s
21	0.95 d, (6.5)	0.87 d, (6.0)
26	0.87 d, (7.0)	0.78 d, (7.6)
27	0.88 d, (7.0)	0.76 d, (8.2)
29	0.97 t, (7.5)	0.79 t, (7.6)
1'	4.20 d, (7.9)	4.36 d, (7.6)
2'	2.89 dt (8.0, 4.5)	3.25 dd (7.2, 6.4) ^b
3'	3.27 dt (8.0, 4.5)	3.45 dd (7.2, 6.4)
4'	3.00 dt (8.0, 4.5)	3.27 dd (7.2, 4.5) ^b
5'	3.06 dt (8.0, 4.5)	3.49 m ^a
6'	4.55 dd (11.7, 2.5)	3.81 dd (11.9, 3.2)
	4.40 dd (11.7, 5.2)	3.73 dd (11.9, 3.2)

^{a, b}Overlapped signals.

*(Peshin and Kar, 2017)

4.16 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ EH 15

การแยกของสารประกอบบริสุทธิ์ EH 15

สารประกอบ EH 15 ลักษณะของแข็งสีขาว น้ำหนัก 5.9 มิลลิกรัม โดยแยกจาก Fr.9/28 (2.25 กรัม) ซึ่งเป็นส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดชั้น CH_2Cl_2 (60.00 กรัม) ดังแสดงในภาพประกอบ 6

โดยเมื่อนำ Fr. 9/28 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane- CH_2Cl_2 (50:50) จนถึง CH_2Cl_2 -MeOH (90:10) ได้สารทั้งหมด 21 ส่วนย่อย (Fr. 1-21/9) นำ Fr. 4-7/9 (528.6 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 3 ครั้งบน silica gel โดยใช้ตัวพาระบบ Hexane- CH_2Cl_2 (86:14-70:30) ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนย่อย (Fr. 1-4/42) นำ Fr. 2-3/42 (436.8 มิลลิกรัม) มาแยกโดยใช้ตัวพาระบบ Hexane- CH_2Cl_2 (80:20) ได้สารทั้งหมด 7 ส่วนย่อย (Fr. 1-7/45) นำ Fr. 5/45 (293.8 มิลลิกรัม) มาแยกซ้ำด้วยตัวพาระบบ Hexane-EtOAc (99.5:0.5) ได้สารทั้งหมด 7 ส่วนย่อย (Fr. 1-7/65) เมื่อนำ Fr.6/65 (5.9 มิลลิกรัม) มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบบริสุทธิ์ EH 15

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ EH 15

สารประกอบ EH 15 ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 5.9 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 191-193 °C [lit. mp = 190-192 °C] (Prachayasittikul et al., 2010)

FTIR- spectrum แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 2937 และ 2855 cm^{-1} (C-H stretching) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1730 cm^{-1} (C=O stretching) ของหมู่ carbonyl ที่ ν_{max} 1641 cm^{-1} (C=C stretching) ของ alkene ที่ ν_{max} 1453, 1366, 1247, 1147 และ 1104 cm^{-1} (C-H bending) ของ methyl กับ methylene ที่ ν_{max} 1023 และ 1013 cm^{-1} (C-O stretching) ของหมู่ ester ที่ ν_{max} 978, 901, 877, 656, 627 และ 607 cm^{-1} (C-H out of plane bending) ของ alkene

Mass spectrum แสดง pseudomolecular ion peak ที่ m/z 491.3796 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2\text{Na}$, 491.3852) ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบ EH 15 คือ $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$

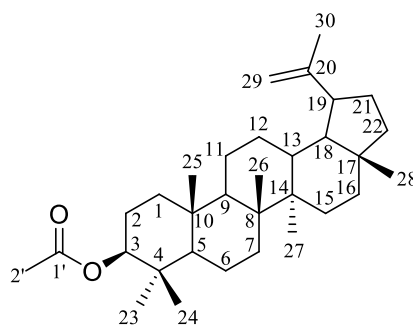
^{13}C -NMR spectrum ใน CDCl_3 ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 32 อะตอม เมื่อพิจารณา ร่วมกับ HMQC spectrum ระบุได้ว่าโครงสร้างสารนี้ประกอบด้วย methyl carbon 8 อะตอม methylene carbon 11 อะตอม methine carbon 6 อะตอม (โดยเป็น oxymethine carbon 1 อะตอม) quaternary carbon 6 อะตอม และ carbonyl carbon 1 อะตอม (δ_{C} 170.9)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล spectroscopic ของ ^1H และ ^{13}C -NMR spectra ของสารประกอบ EH 15 กับ lupeol acetate ที่เคยมีรายงานไว้ ดังแสดงในตารางที่ 15 พบมีลักษณะของสัญญาณคล้ายกัน

โดยปรากฏสัญญาณ singlet ของ methyl proton ที่ δ_{H} 2.02, 1.65, 1.00, 0.94, 0.82, 0.81, 0.80 และ 0.76 ของ H-2', H-30, H-26, H-27, H-23, H-25, H-28 และ H-24 ตามลำดับ สัญญาณของ vinyl proton ที่ δ_{H} 4.66 (br d, $J = 2.2$ Hz) และ 4.56 (br dd, $J = 2.3, 1.3$ Hz) ของ H-29a และ H-29b สัญญาณของ cabinolic proton ที่ δ_{H} 4.44 (dd, $J = 10.4, 5.8$ Hz) และ carbonyl carbon ที่ δ_{C} 170.9

การกำหนดค่า chemical shift ของ ^1H และ ^{13}C -NMR แต่ละตำแหน่งของโครงสร้างสารประกอบ **EH 15** อาศัยการเปรียบเทียบกับข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ที่มีรายงานไว้ของสารประกอบ lupeol acetate (Prachayasittikul et al., 2010) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 15

สรุปได้ว่า สารประกอบ **EH 15** คือ lupeol acetate ซึ่งเป็นสารประเภท triterpene ซึ่งเคยมีรายงานการแยกจากต้น *Diospyros rubra* (Prachayasittikul et al., 2010) และ *Cycas vespertilio* (Ng et al., 2015)



สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **EH 15**

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ lupeol acetate กับสารประกอบ EH 15

Position	lupeol acetate*		สารประกอบ EH 15 (CDCl ₃)	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type
1		38.3, CH ₂	-	38.4, CH ₂
2		23.7, CH ₂		23.7, CH ₂
3	4.44 dd (10.8, 5.8)	80.9, CH	4.44 dd (10.4, 5.8)	81.0, CH
4	-	37.7, C	-	37.8, C
5	0.76 dd (10.8, 5.8)	55.3, CH	0.77 dd (7.4, 4.9)	55.4, CH
6		18.1, CH ₂		18.2, CH ₂
7		34.2, CH ₂		34.2, CH ₂
8	-	40.8, C	-	40.8, C
9		50.3, CH		50.3, CH
10	-	37.0, C	-	37.1, C
11		20.9, CH ₂		20.9, CH ₂
12		25.0, CH ₂		25.1, CH ₂
13		38.0, CH		38.0, CH
14	-	42.8, C	-	42.8, C
15		27.4, CH ₂		27.4, CH ₂
16		35.5, CH ₂		35.5, CH ₂
17	-	42.9, C	-	43.0, C
18		48.0, CH		48.0, CH
19	2.33 dt (11.1, 5.6)	48.2, CH	2.35 ddd (16.5, 11.0, 5.4)	48.3, CH
20	-	150.9, C	-	150.9, C
21	1.82-1.93 m	29.8, CH ₂	1.83-1.94 m	29.8, CH ₂
22		39.9 CH ₂		40.0, CH ₂
23	0.82 s	28.2, CH ₃	0.82 s	27.9, CH ₃
24	0.82 s	15.9, CH ₃	0.76 s	15.9, CH ₃
25	0.82 s	16.1, CH ₃	0.81 s	16.1, CH ₃
26	1.00 s	16.4, CH ₃	1.00 s	16.4, CH ₃
27	0.91 s	14.5, CH ₃	0.94 s	14.5, CH ₃
28	0.81 s	17.9, CH ₃	0.80 s	18.0, CH ₃
29a	4.66 br s	109.3, CH ₂	4.66 br d (2.2)	109.3, CH ₂
29b	4.54 br s		4.56 br dd (2.3, 1.3)	
30	1.66 s	19.0, CH ₃	1.65 s	19.3, CH ₃
3-O-acetyl				
1'	-	171.0, C	-	170.9, C
2'	2.01 s	21.3, CH ₃	2.02 s	21.2, CH ₃

*(Prachayasittikul et al., 2010)

4.17 การพิสูจน์โครงสร้างสเตอริโอเคมีด้วยเทคนิคทางเคมีคำนวณ

ทำการ minimizations หา conformers ของโครงสร้างสารประกอบ **EH 1**, **EH 3** และ **EH 7** ด้วยโปรแกรม DataWarrior (Sander et al., 2015) และ generate conformers บนพารามิเตอร์แบบ random low energy ด้วย MMFF94s force field นำผลที่ได้ทำการ optimize และคำนวณ electronic excitation energy ด้วยโปรแกรม Gaussian 09 revision D.01 (Frisch et al., 2013)

ในขั้นตอนการ optimize โครงสร้างทั้งหมด คำนวณบนพารามิเตอร์แบบ hybrid density functional B3LYP/6-31G(d) level และหลังจากนั้นคำนวณ Electronic Circular Dichroism (ECD) ต่อด้วยพารามิเตอร์ single point energy, time-dependent density functional theory (TDDFT) method และ CAM-B3LYP/6-31G(2d,p) level ใช้รูปแบบโมเดลตัวทำละลายเป็น conductor-like polarizable continuum model (C-PCM) (Yanai, Tew, and Handy, 2004) ในตัวทำละลาย MeOH นำผลที่ได้สร้างกราฟ ECD ด้วยการ overlapping Gaussian functions บนโปรแกรม Gauss Sum (O'Boyle, Tenderholt, and Langner, 2008)

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปการดำเนินงานวิจัย

การวิจัยเรื่อง “องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง” มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง และเพื่อศึกษาหาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยแบบทดลอง ด้วยการนำตัวอย่างคือส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง มาผ่านกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ และแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้ววิเคราะห์ข้อมูลหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และวิเคราะห์ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด ของสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน สารสกัดชั้นเมทานอล และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้ายาง พบว่าในสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนและเมทานอล สามารถแยกสารบริสุทธิ์และพิสจูจน์โครงสร้างทางเคมีได้รวม 15 ชนิด โดยเป็นสารที่มีโครงสร้างสเตอริโอเคมีที่ยังไม่เคยมีรายงานในกลุ่ม megastigmane 3 ชนิดคือ (3*R*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 5**), (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol (**EH 7**) และ (1*S*,5*S*,6*S*,7*E*,9*S*)-drummondol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 8**) และสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว 12 ชนิด เป็นสารกลุ่ม megastigmane 5 ชนิด คือ blumenol A (หรือ vomifoliol) (**EH 1**), (6*S*)-dehydrovomifoliol (**EH 2**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigmane-7-ene-3,5,6,9-tetrol (**EH 3**), (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH 4**) และ (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-ene-9-oxo-megastigmane (**EH 6**) สารกลุ่ม diterpene 2 ชนิด คือ *ent*-kaurane-3 β ,16 β ,17-triol (**EH 9**) และ 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadecan-1,2-diol (**EH 10**) สารกลุ่ม triterpene 2 ชนิด คือ glut-5-en-3 β -ol (**EH 11**) และ lupeol acetate (**EH 15**) สารกลุ่ม sterol 3 ชนิด คือ stigmast-4-en-3 α ,6 β -diol (**EH 12**), β -sitosterol (**EH 13**) และ β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucoside (**EH 14**)

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cells) ได้ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.30 $\mu\text{g/mL}$ และแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) ในระดับต่ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 159.44 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $4.16 \pm 1.02 \mu\text{M}$ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HelaS3 cells) ได้ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $14.48 \pm 5.17 \mu\text{M}$ และพบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลส่วนใบและสารสกัดชั้นเมทานอลส่วนต้น แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในระดับต่ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 157.21 $\mu\text{g/mL}$ และ 463.36 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และเมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ในปริมาณเพียงพอ 9 ชนิด ได้แก่ สารประกอบ **EH 1, EH 2, EH 3, EH 4, EH 6, EH 9, EH 10, EH 11** และ **EH 12** มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่ามีเฉพาะสารประกอบ glut-5-en-3 β -ol (**EH 11**) ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $9.86 \pm 1.07 \mu\text{M}$ และ $9.72 \pm 0.58 \mu\text{M}$ ตามลำดับ

อภิปรายผล

1. ปริมาณสารบางส่วนย่อยที่แยกได้มีปริมาณน้อย ทำให้ไม่สามารถแยกให้ได้สารบริสุทธิ์และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีได้
2. สารบริสุทธิ์กลุ่ม megastigmane บางชนิดที่แยกได้มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแสดงผลในระดับปานกลาง ดังนั้นหากสารบริสุทธิ์มีปริมาณมากพอต่อการทดสอบ อาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้
3. สารบริสุทธิ์บางชนิดที่แยกได้ แม้มีปริมาณเพียงพอต่อการส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่เนื่องจากเป็นสารที่มีการรายงานมามากแล้ว จึงไม่ได้มีเป้าหมายส่งทดสอบฤทธิ์ในการวิจัยครั้งนี้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการวิจัยแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วนอื่นๆ เช่น ราก และผลของต้นหญ้าอย่างเพิ่มเติม
2. ควรทำการวิจัยโดยใช้พืชสมุนไพรที่มีปริมาณมาก เพราะจะทำให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีน้ำหนักมากพอต่อการนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งนี้เพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สมบูรณ์ของต้นหญ้า

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. สำนักงาน
หอพรรณไม้. 2557. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ.
2557.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- ดวงพร สุวรรณกุล และรังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2545. **รายชื่อวัชพืชในประเทศไทย.**
กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ตรีเพชร กาญจนภูมิ. 2552. **เคมีของสมุนไพร การหาโครงสร้างเคมีของสารแอโรแมติกไกลโคไซด์
ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี.** กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- เทวีรัตน์ ศรีทอง. 2548. “ประสิทธิภาพของผลมะเกลือ เมล็ดสะแกนา ต้นหญ้ายาง และเมล็ด
ผักทองต่อการกำจัดตัวเต็มวัยของพยาธิไส้เดือน (*Ascaridia galli*) ในไก่พื้นเมือง และไก่ไข่.”
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารศึกษาศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธวัชชัย รัตน์ชเลศ และเจมส์ เอฟ. แมกซ์เวล. 2540. **รายชื่อวัชพืชที่รายงานในประเทศไทย.**
พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เวิร์เพรส.
- ธัญชนก จงรักไทย ศิริพร ซึ่งสนธิพร และกาญจนา พงกษพันธ์. 2556. “สัณฐานวิทยาของเมล็ด
วัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์ *Euphorbia* Seed Morphology of *Euphorbia* Weeds.” ใน **รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี 2556 เล่ม 3.**, หน้า 2106-2120. นนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์
การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2541. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน(2).**
กรุงเทพมหานคร: ประชาชน.
- เพ็ญญา ทรัพย์เจริญ. 2550. **สมุนไพรในอุทยานแห่งชาติภาคใต้. ชุดภูมิปัญญาไทยและสมุนไพร.**
กรุงเทพมหานคร: สามเจริญพาณิชย์ (กรุงเทพฯ).
- วันดี กฤษณพันธ์. 2544. “พฤษเคมีเบื้องต้น” ใน นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ),
เภสัชวินิจฉัย-ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1., หน้า 34-102. พิมพ์ครั้งที่ 3.
กรุงเทพมหานคร: แสงเทียนการพิมพ์
- สุรัชย์ มัจฉาชีพ. 2544. **วัชพืชในประเทศไทย.** กรุงเทพมหานคร: แพร่พิทยา.
- อรอุมา ภูประเสริฐ และอุทัย โสธนะพันธุ์. 2544. “สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากลำต้นของหญ้ายาง.”
รายงานการวิจัย ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

- Achmad, S.A., et al. 1996. "A New Prenylated Flavone from *Artocarpus champeden*." **Journal of Natural Products** 59, 9: 878–879.
- Akihisa, T., et al. 2002. "Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol ("Antiquol C") and Other Triterpenes from *Euphorbia antiquorum* Latex and Their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation." **Journal of Natural Products** 65, 2: 158-162.
- Andersson, R., and Lundgren, L.N. 1988. "Monoaryl and Cyclohexenone Glycosides from Needles of *Pinus sylvestris*." **Phytochemistry** 27, 2: 559-562.
- Bercht, C.A.L., et al. 1976. "Isolation of Vomifoliol and Dihydrovomifoliol from *Cannabis*." **Phytochemistry** 15: 830-831.
- Calis, I., et al. 2002. "(6*S*)-Hydroxy-3-oxo- α -ionol Glucosides from *Capparis spinosa* Fruits." **Phytochemistry** 59, 4: 451-457.
- Cutillo, F., et al. 2005. "C₁₃ Norisoprenoids from *Brassica fruticulosa*." **Natural Product Research** 19, 2: 99-103.
- Demole, E., and Enggist, P. 1974. "Novel Synthesis of 3,5,5-Trimethyl-4-(2-butenylidene)-cyclohex-2-en-1-one, a Major Constituent of Burley Tobacco Flavour." **Helvetica Chimica Acta** 57: 2087-2091.
- Dou, D.-Q., et al. 2010. "Studies on Chemical Constituents of the Leaves of *Smallantus sonchifolius* (Yacon): Structures of Two New Diterpenes." **Natural Product Research** 24, 1: 40-47.
- El-Seedi, H. R. 2005. "Antimicrobial Triterpenes from *Poulsenia armata* Miq. Standl." **Natural Product Research** 19, 2: 197-202.
- Erden, Y.S., et al. 1999. "Traditional Medicine in Turkey IX, Folk Medicine in North West Anatolia." **Journal of Ethnopharmacology** 64: 201.
- Ernst, M., et al. 2015. "Global Medicinal Uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae)." **Journal of Ethnopharmacology** 176: 90-101.
- Falodun, A., Agbakwuru, E.O.P., and Ukoh, G.C. 2003. "Antibacterial Activity of *Euphorbia heterophylla* Linn (Family Euphorbiaceae)." **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research** 46, 6: 471-472.

- Falodun, A., Okunrobo, L.O., and Uzoamaka, N. 2006. "Phytochemical Screening and Anti-inflammatory Evaluation of Methanolic and Aqueous Extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (Euphorbiaceae)." **African Journal of Biotechnology** 5, 6: 529-531.
- Fred-Jaiyesimi, A. A., and Abo, K. A. 2010. "Phytochemical and Antimicrobial Analysis of the Crude Extract, Petroleum Ether and Chloroform Fractions of *Euphorbia heterophylla* Linn Whole Plant." **Pharmacognosy Journal** 2, 16: 1-4.
- Frisch, M. J., et al. 2013. **Gaussian 09, Revision D.01**, Gaussian Inc., Wallingford CT.
- Galbraith, M.N., and Horn, D.H.S. 1973. "Stereochemistry of the Blumenols : Conversion of Blumenol A into (S)-(+)-Abscisic Acid." **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications** No.16: 566-567.
- Gupta, B., Srivastava, R.S., and Goyal, R. 2007. "Therapeutic Uses of *Euphorbia thymifolia*: A Review." **Pharmacognosy Reviews** 1, 2: 299-304.
- Hammami, S., et al. 2004. "Isolation and Structure Elucidation of a Flavanone, a Flavanone Glycoside and Vomifoliol from *Echiochilon fruticosum* Growing in Tunisia." **Molecules** 9, 7: 602-608.
- Hao, X., et al. 2013. "Chemical Constituents from *Teucrium viscidum*." **Biochemical Systematics and Ecology** 51: 78-82.
- Jiang, H.-X., et al. 2006. "Terpenoids from *Eupatorium fortunei* TURCZ." **Helvetica Chimica Acta** 89, 3: 558-566.
- Juthamane Youkwan. 2002. "Chemical Constituents and some Bioactivities of the Leaves of *Phyllanthus polyphyllus* Willd. var. *siamensis* Airy Shaw." Master's Thesis, Applied Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.
- Kai, H., Baba, M., and Okuyama, T. 2007. "Two New Megastigmanes from the Leaves of *Cucumis sativus*." **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 55, 1: 133-136.
- Kim, I., et al. 2004. "Norisoprenoids and Hepatoprotective Flavone Glycosides from the Aerial Parts of *Beta vulgaris* var. *cicla*." **Archives of Pharmacal Research** 27, 6: 600-603.
- Li, X., et al. 1990. "Ent-Kauranoid Diterpenes from *Artemisia sacrorum*." **Journal of Natural Products** 53, 3: 657-661.
- Ng, V. A. S., et al. 2015. "Secondary Metabolites from the Male Cone of *Cycas vespertilio*." **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research** 7, 4: 727-731.

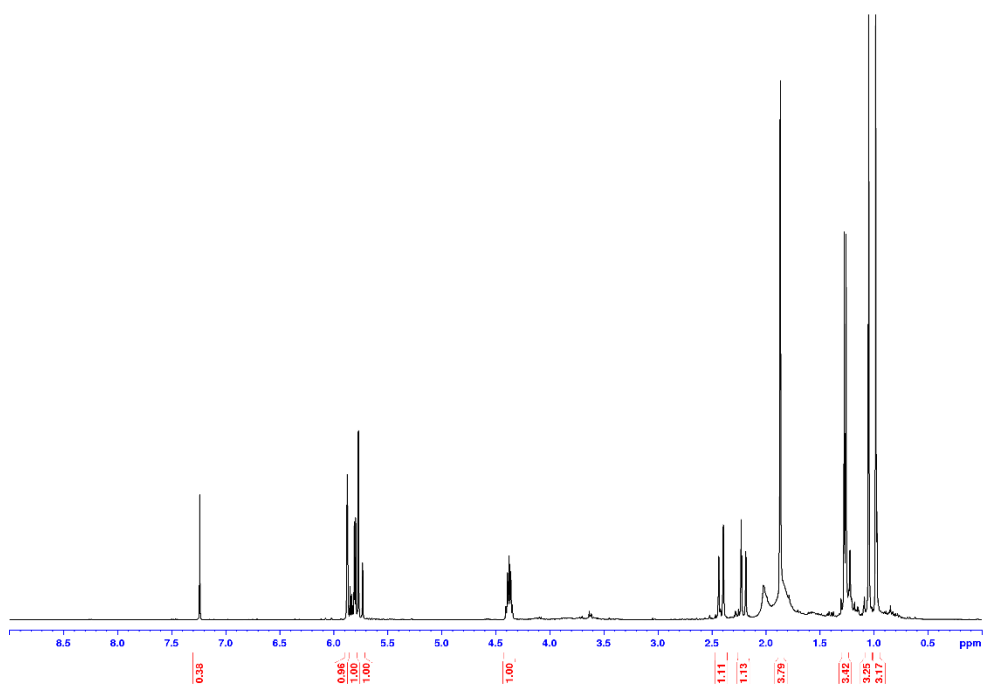
- O'Boyle, N. M., Tenderholt, A. L., and Langner, K. M. 2008. "Cclib: A Library for Package-Independent Computational Chemistry Algorithms." **Journal of Computational Chemistry** 29, 5: 839–845.
- Okeniyi, S.O., Adedoyin, B.J., and Garba, S. 2013. "Phytochemical Screening, Cytotoxicity, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Stem and Leave Extracts of *Euphorbia heterophylla*." **Journal of Biology and Life Science** 4, 1: 24-31.
- Otsuka, H., et al. 2003. "Stereochemistry of Megastigmane Glucosides from *Glochidion zeylanicum* and *Alangium premnifolium*." **Phytochemistry** 62, 5: 763-768.
- Park, J.-H., et al. 2011. "Isolation of Megastigmane Sesquiterpenes from the Silkworm (*Bombyx mori* L.) Droppings and Their Promotion Activity on HO-1 and SIRT1." **Archives of Pharmacal Research** 34, 4: 533-542.
- Patil, S.B., Naikwade, N.S., and Magdum, C.S. 2009. "Review on Phytochemistry and Pharmacological Aspects of *Euphorbia hirta* Linn." **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care** 1, 1: 113-133.
- Peshin, T., and Kar, H. K. 2017. "Isolation and Characterization of β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside from the Extract of the Flowers of *Viola odorata*." **British Journal of Pharmaceutical Research** 16, 4: 1-8.
- Powell, R. G., and Smith, C.R., Jr. 1981. "An Investigation of the Antitumor Activity of *Sesbania drummondii*." **Journal of Natural Products** 44, 1: 86–90.
- Prachayasittikul, S., et al. 2010. "New Bioactive Triterpenoids and Antimalarial Activity of *Diospyros rubra* Lec." **EXCLI Journal** 9:1-10.
- Qi, W.-Y., et al. 2014. "Ingol-Type Diterpenes from *Euphorbia antiquorum* with Mouse 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibition Activity." **Journal of Natural Products** 77, 6: 1452-1458.
- Qi, W.-Y., et al. 2018. "Quorumolides A-C, Three Cembranoids from *Euphorbia antiquorum*." **The Journal of Organic Chemistry** 83, 2: 1041-1045.
- Qiu, Y.-K., et al. 2008. "Three Novel Compounds from the Leaves of *Smallanthus sonchifolius*." **Journal of Asian Natural Products Research** 10, 12: 1109-1115.

- Reddy, M.K., et al. 2007. "Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L." **Planta Medica** 73, 5: 461-467.
- Sander, T., et al. 2015. "DataWarrior: An Open-Source Program for Chemistry Aware DataVisualization and Analysis." **Journal of Chemical Information and Modeling** 55, 2: 460-473.
- Shi, D., et al. 2008. "Steroids from Green Alga *Chaetomorpha basiretorsa* Setchell." **Chinese Journal of Oceanology and Limnology** 26, 4: 415-418.
- Shi, Q.-W., Su, X.-H., and Kiyota, H. 2008. "Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphobia*." **Chemical Reviews** 108, 10: 4295-4327.
- Sundaram, M.M., et al. 2010. "Antimicrobial and Anticancer Studies on *Euphorbia heterophylla*." **Journal of Pharmacy Research** 3, 9: 2332-2333.
- Suriphon Singha. 2018. "Chemical Constituents and Biological Activities of the Fruits of *Siphonodon celastrineus* Griff." Master's Thesis, Applied Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.
- Sutthivaiyakit, S., Thapsut, M., and Prachayasittikul, V. 2000. "Constituents and Bioactivity of the Tubers of *Euphorbia sessiliflora*." **Phytochemistry** 53, 8: 947-950.
- Tan, S.T., Wilkins, A.L., and Holland, P.T. 1989. "Isolation and X-ray Crystal Structure of (*E*)-4-(*r*-1',*t*-2',*c*-4'-Trihydroxy-2',6',6'-trimethyl-cyclohexyl)but-3-en-2-one, a Constituent of New Zealand Thyme Honey." **Australian Journal of Chemistry** 42, 10: 1799-1804.
- Unekwe, P.C., Ughachukwu, P.O., and Ogamba, J.O. 2006. "Some Pharmacological Studies of Aqueous Extract of Leaves of *Euphorbia heterophylla*." **Tropical Journal of Medical Research** 10, 2: 1-5.
- Urones, J.G., et al. 1987. "Acetophenones and Terpenoids from *Senecio gallicus*." **Phytochemistry** 26, 4: 1113-1115.
- Vamsidhar, I., et al. 2000. "Antinociceptive Activity of *Euphorbia heterophylla* Roots." **Fitoterapia** 71, 5: 562-563.
- Vogel, H.G., De Souza, N.J., and D'Sa, A. 1990. "Effect of Terpenoids Isolated from *Centella asiatica* on Granuloma Tissue." **Acta Therapeutica** 16, 4: 285-298.

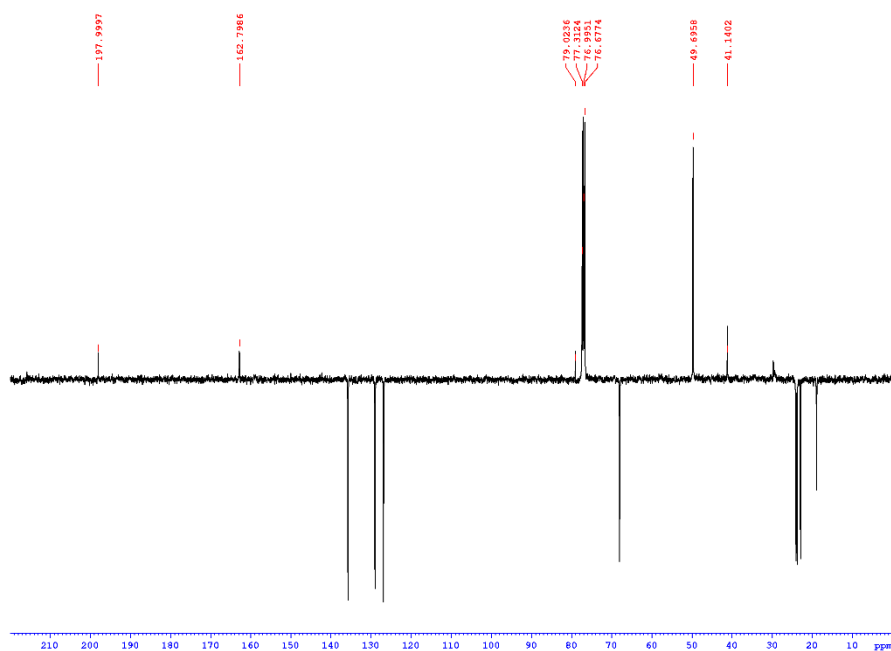
- Weiss, G., Koreeda, M., and Nakanishi, K. 1973. "Stereochemistry of Theaspirone and the Blumenols." **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications** No.16: 565-566.
- Williams, C.A., et al. 1995. "A Biologically Active Lipophilic Flavonol from *Tanacetum parthenium*." **Phytochemistry** 38, 1: 267-270.
- Wu, D., Sorg, B., and Hecker, E. 1995. "New Myrsinol-Related Polyfunctional Pentacyclic Diterpene Esters from Roots of *Euphorbia prolifera*." **Journal of Natural Products** 58, 3: 408-413.
- Wu, J.-Z., et al. 1995. "Structures of Three New Diterpenoids, Fritillebic Acid and Fritillebins A and B, from Bulbs of *Fritillaria ebeiensis* G. D. Yu et G. Q. Ji." **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 43, 9: 1448-1453.
- Xu, J., et al. 2011. "Bioactive Myrsinol Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia prolifera*." **Journal of Natural Products** 74, 10: 2224–2230.
- Xu, J., et al. 2015. "Characterization of Diterpenes from *Euphorbia prolifera* and Their Antifungal Activities against Phytopathogenic Fungi." **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 63, 25: 5902-5910.
- Yanai T, Tew D.P., and Handy N.C. 2004. "A New Hybrid Exchange-Correlation Functional Using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP)." **Chemical Physics Letters** 393, 1-3: 51–57.
- Yu, Q., et al. 2002. "Turpinionosides A-E: Megastigmane Glucosides from Leaves of *Turpinia ternata* NAKAI." **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 50, 5: 640-644.
- Zhang, Z., et al. 2010. "Gynostemosides A–E, Megastigmane Glycosides from *Gynostemma pentaphyllum*." **Phytochemistry** 71, 5-6: 693-700.
- Zhao, J.-X., et al. 2014. "Eurifoloids A-R, Structurally Diverse Diterpenoids from *Euphorbia neriiifolia*." **Journal of Natural Products** 77, 10: 2224-2233.

ภาคผนวก

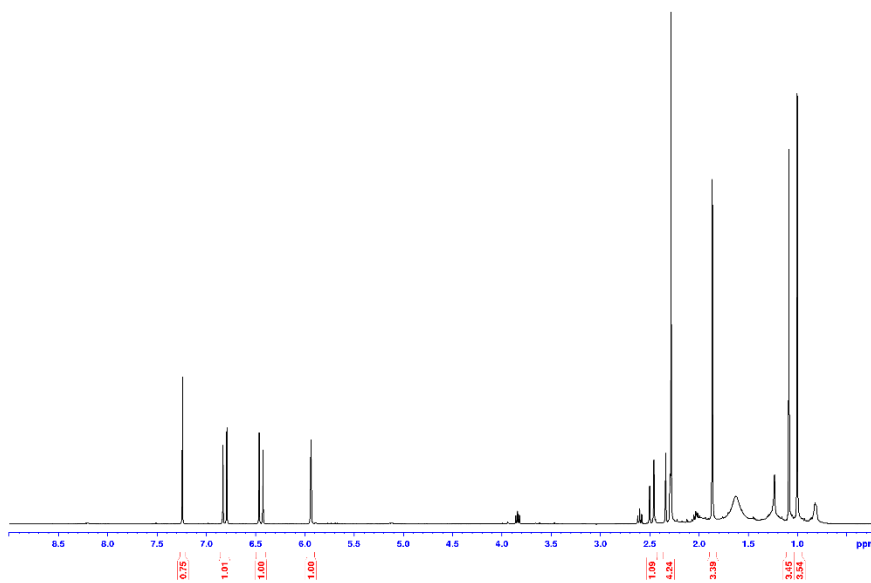
**^1H และ J -modulated ^{13}C NMR Spectra
ของสารประกอบ EH 1 - EH 15**



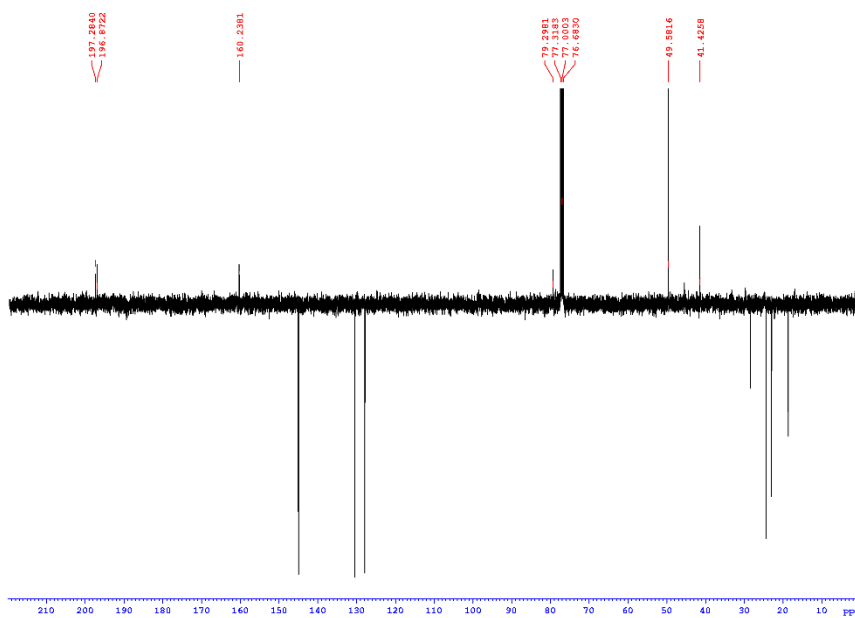
ภาพประกอบ 19 ^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 1



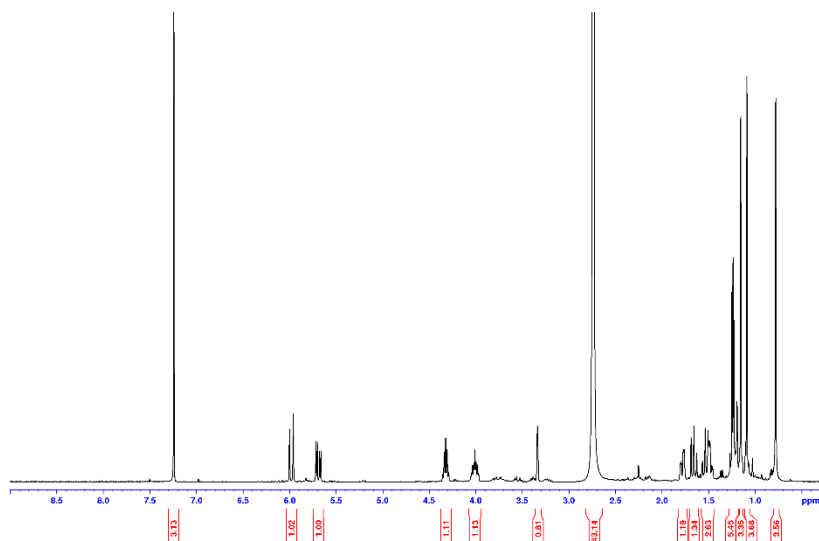
ภาพประกอบ 20 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 1



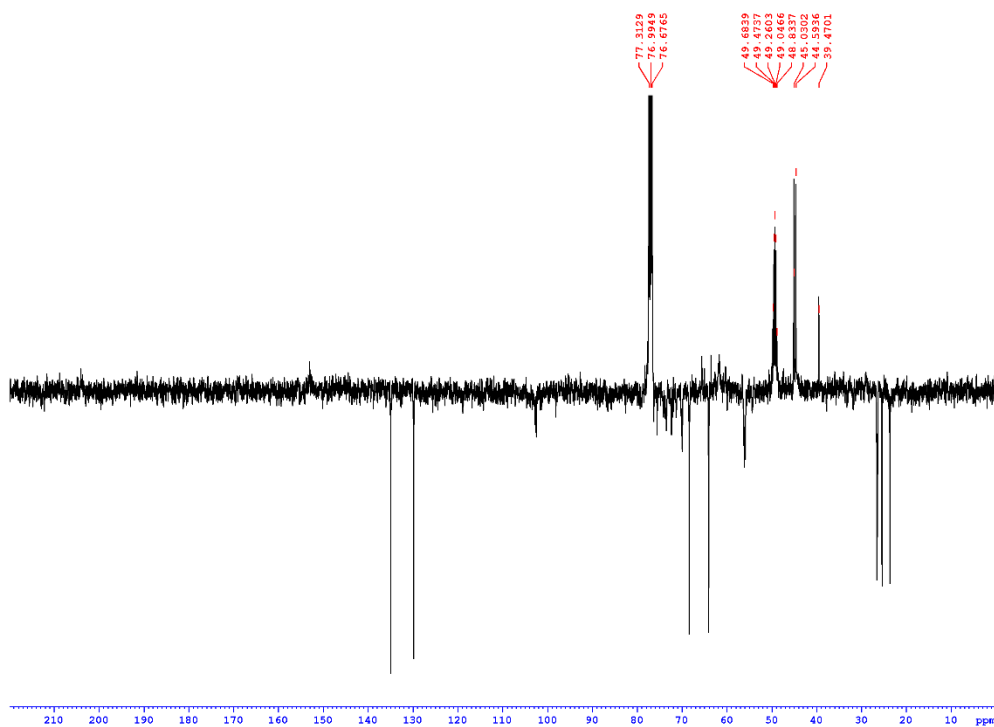
ภาพประกอบ 21 ^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 2



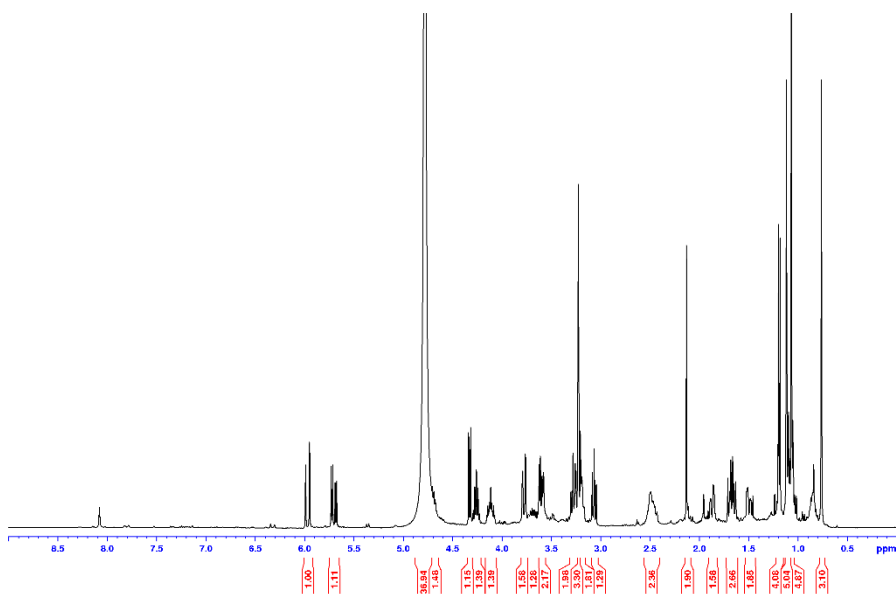
ภาพประกอบ 22 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 2



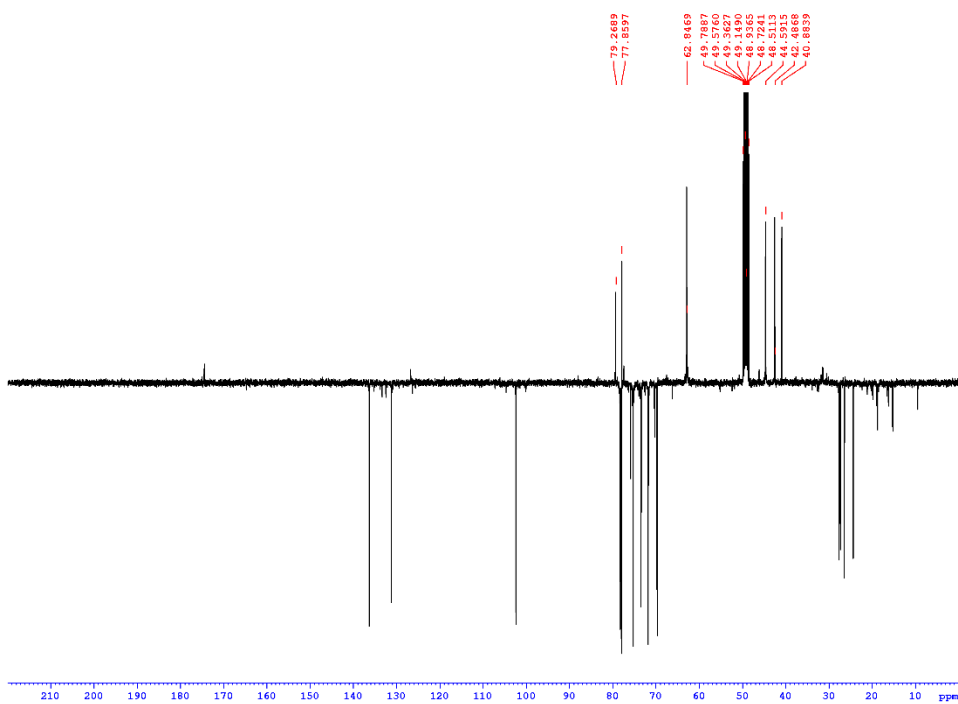
ภาพประกอบ 23 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 3



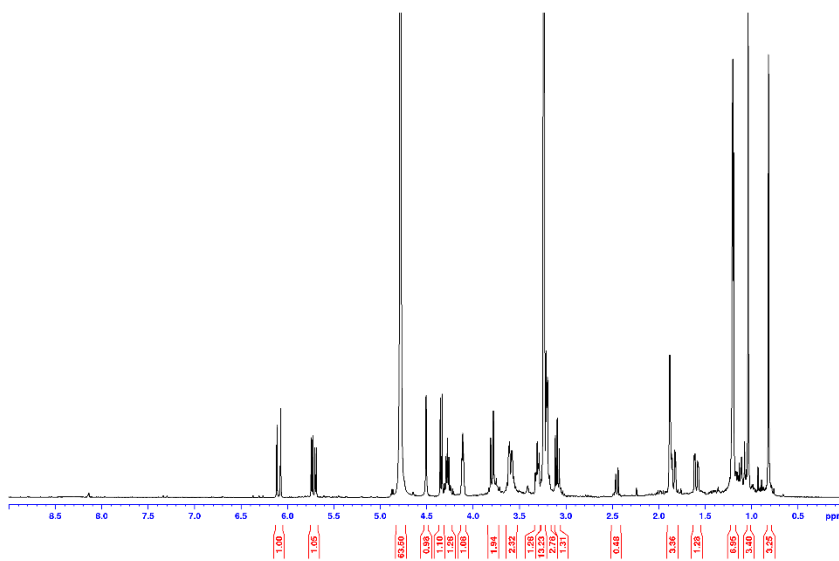
ภาพประกอบ 24 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 3



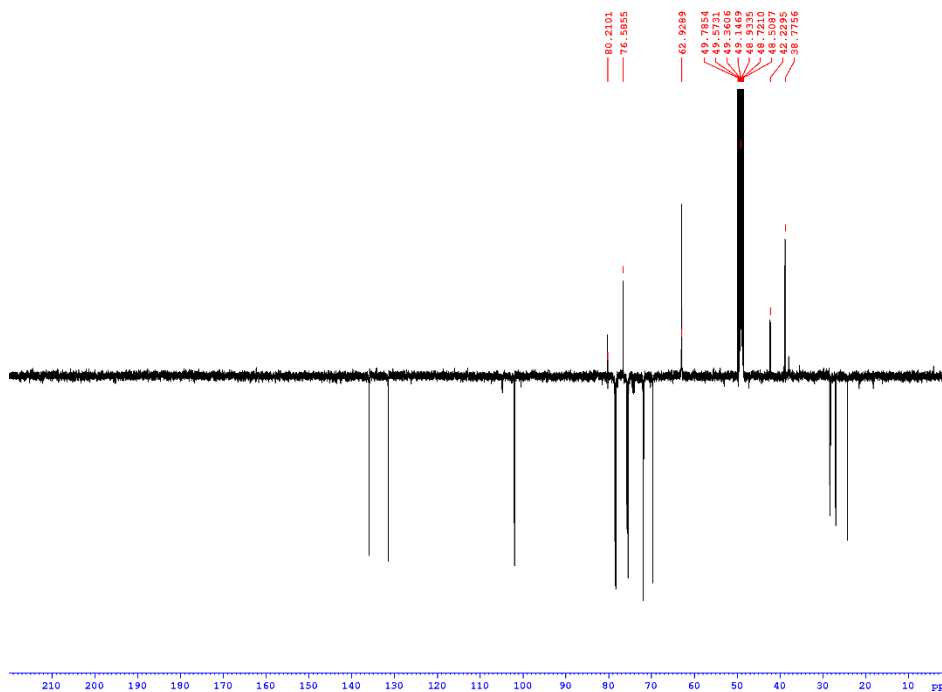
ภาพประกอบ 25 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 4



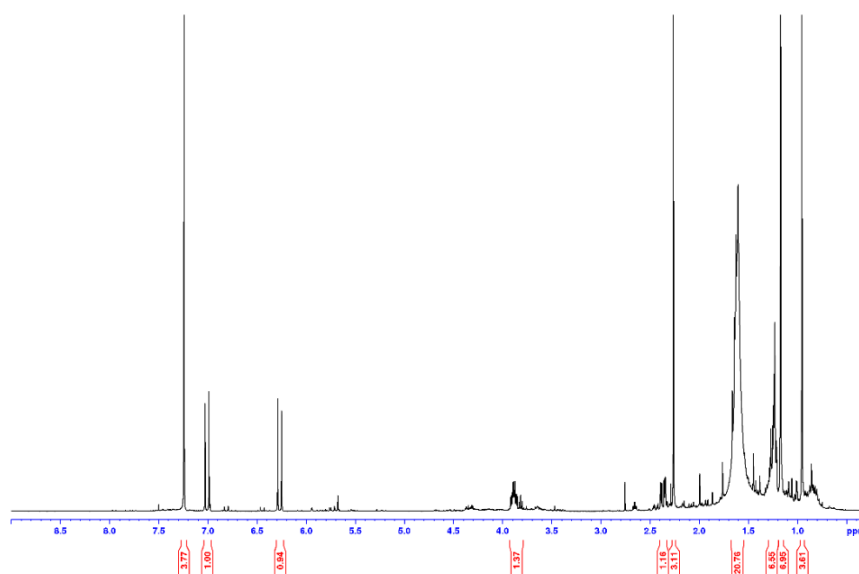
ภาพประกอบ 26 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 4



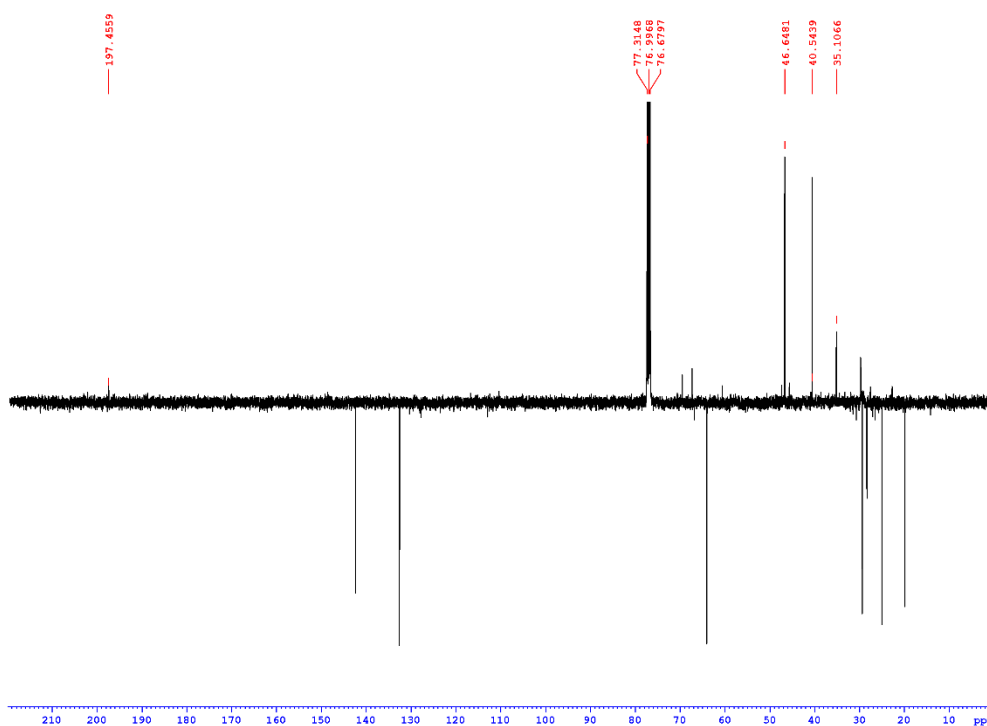
ภาพประกอบ 27 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 5



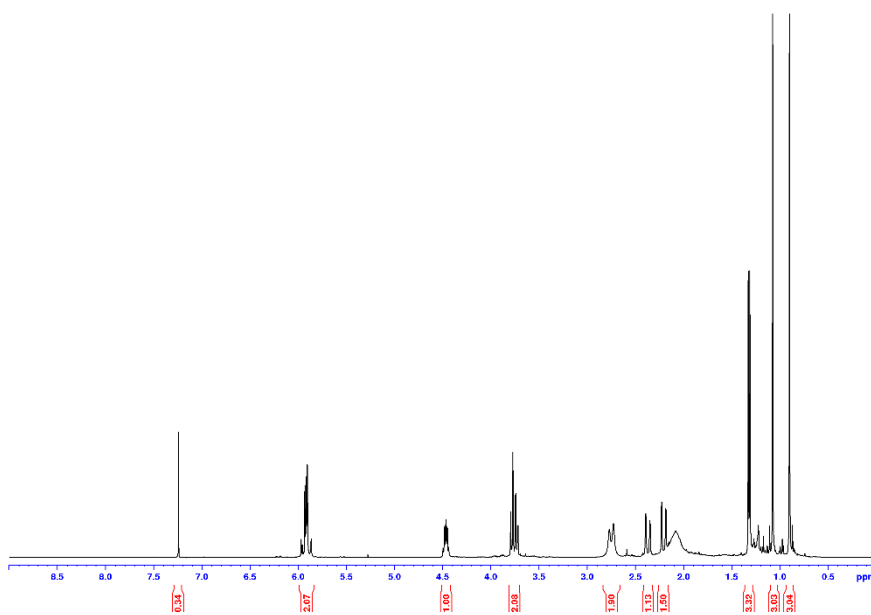
ภาพประกอบ 28 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 5



ภาพประกอบ 29 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 6



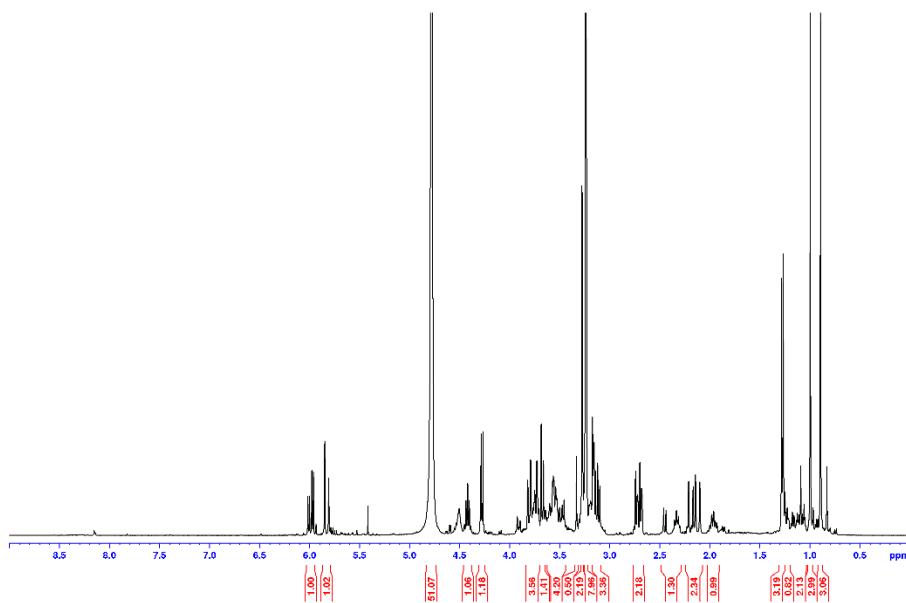
ภาพประกอบ 30 J -modulated $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 6



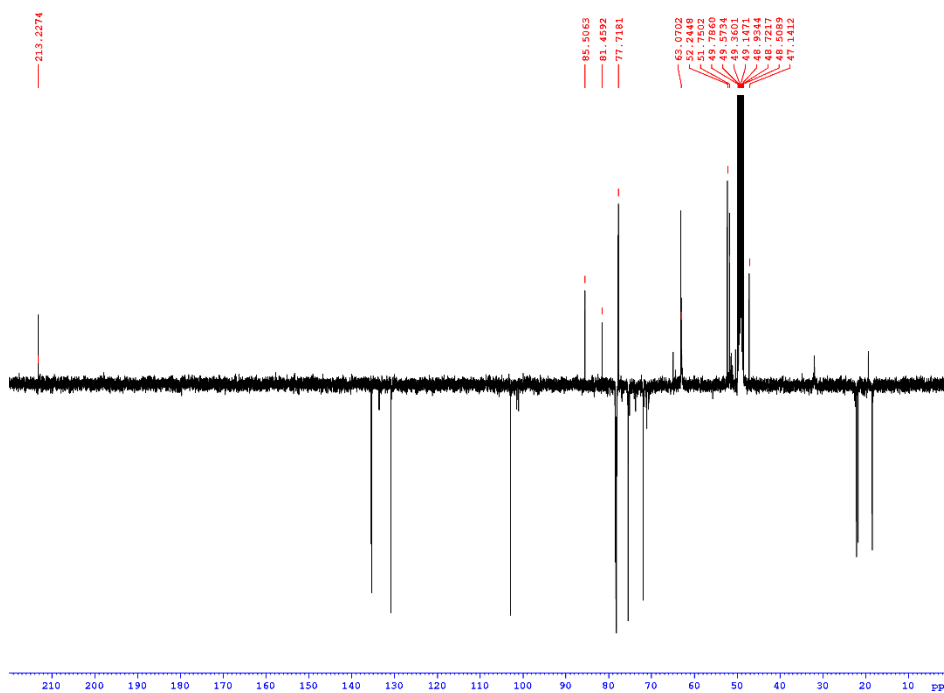
ภาพประกอบ 31 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 7



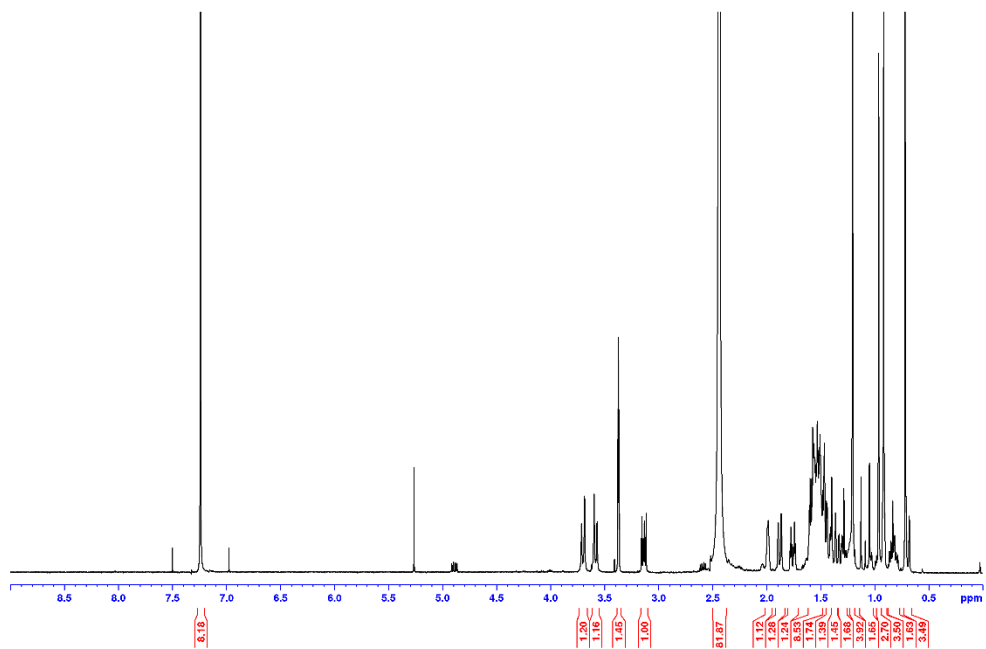
ภาพประกอบ 32 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 7



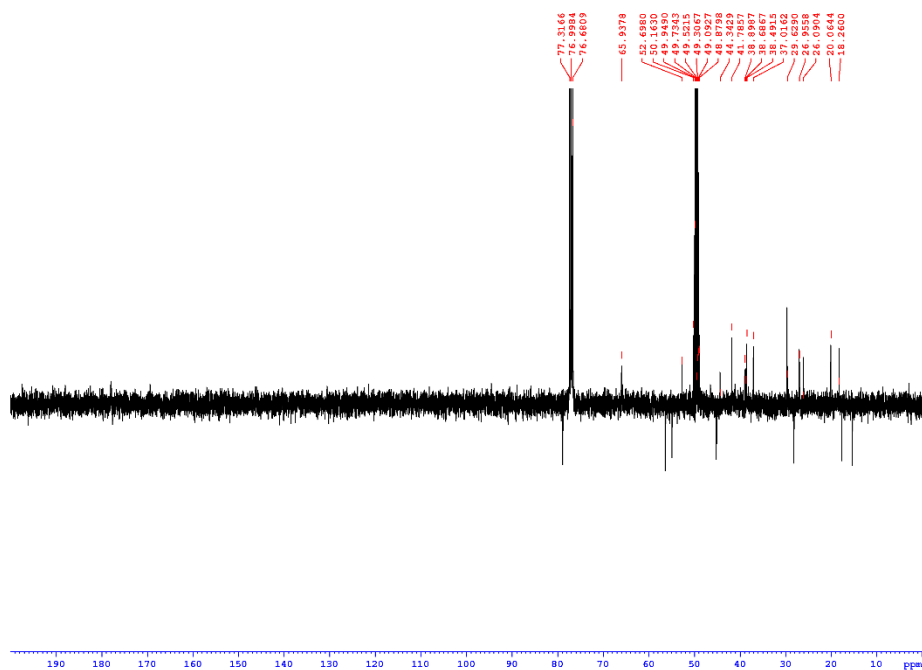
ภาพประกอบ 33 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 8



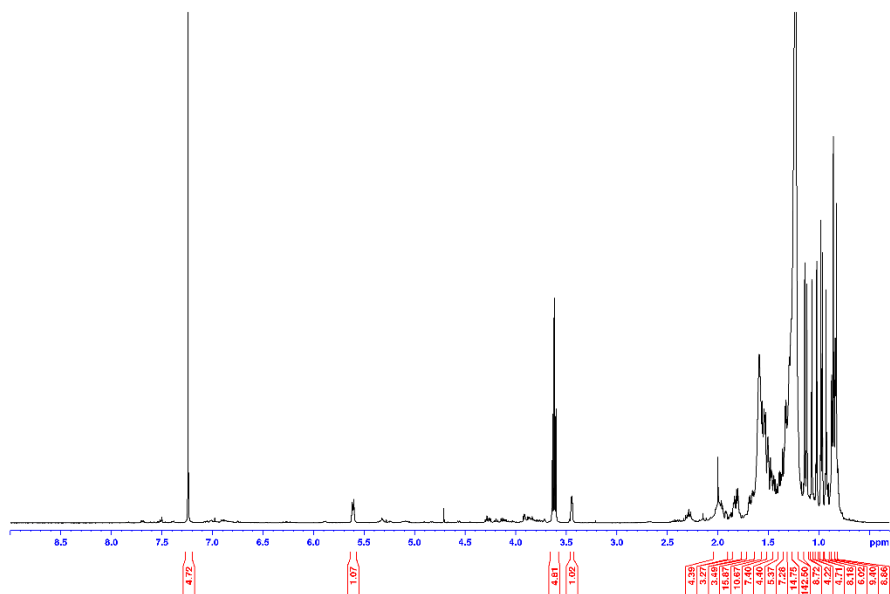
ภาพประกอบ 34 J -modulated $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 8



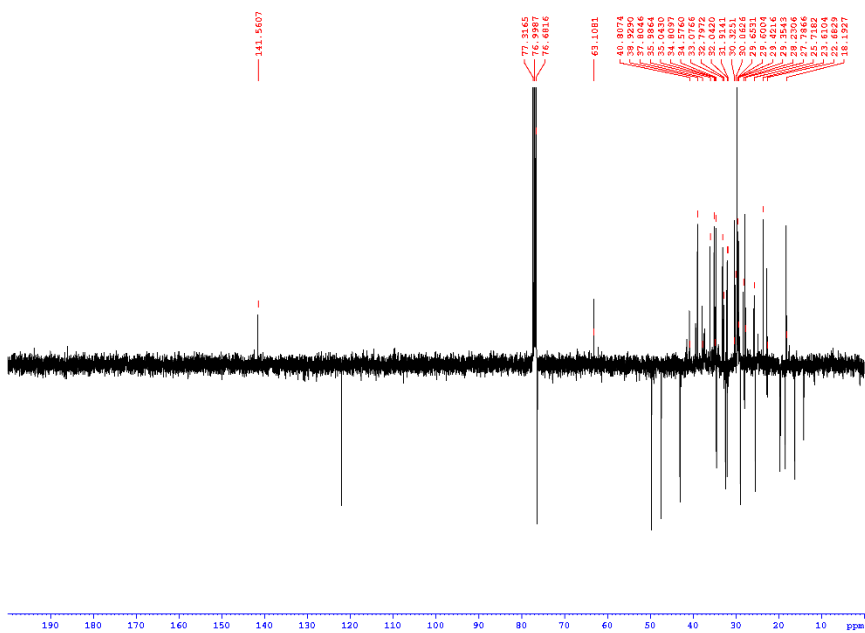
ภาพประกอบ 35 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 9



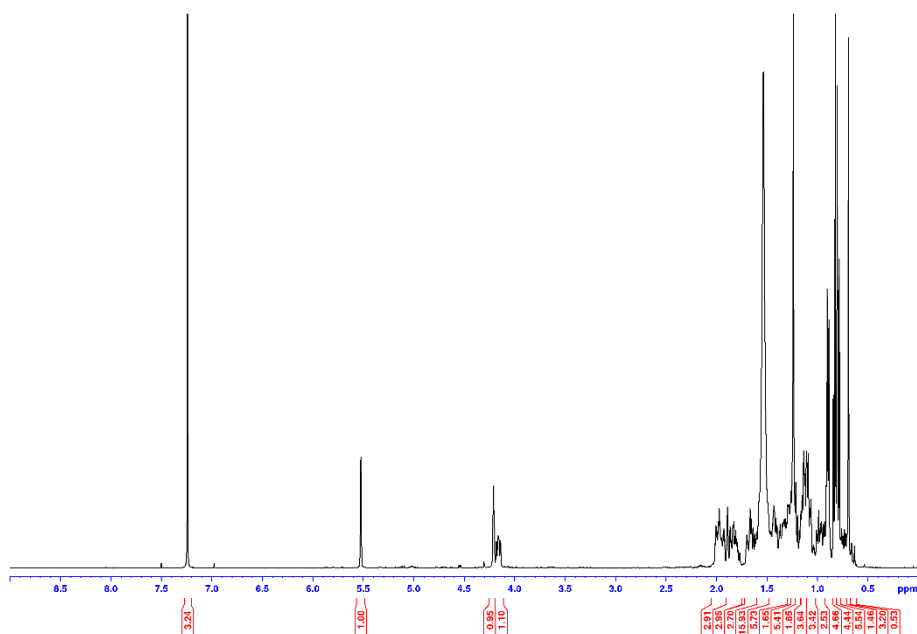
ภาพประกอบ 36 J -modulated $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 9



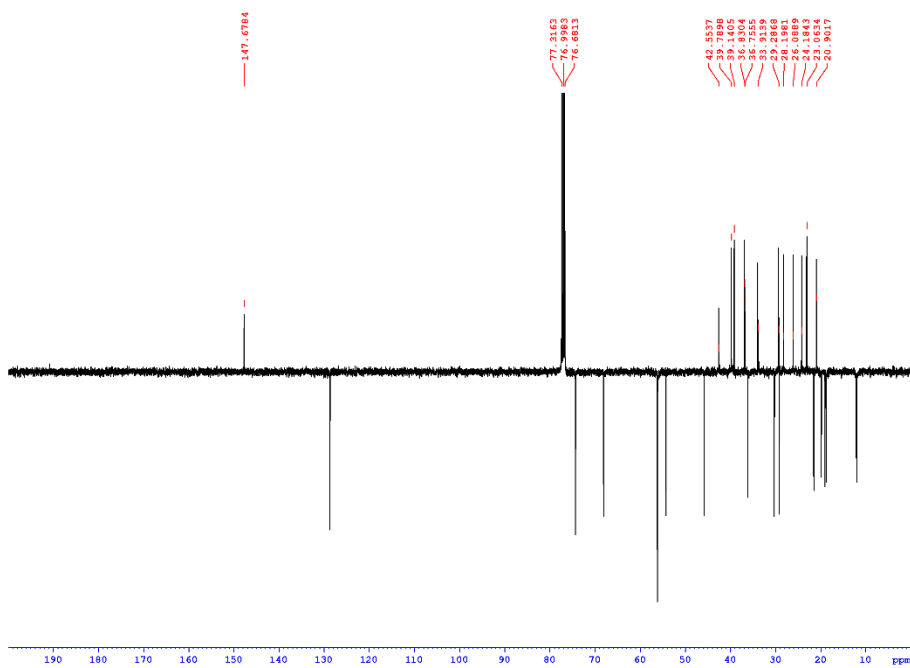
ภาพประกอบ 39 ^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 11



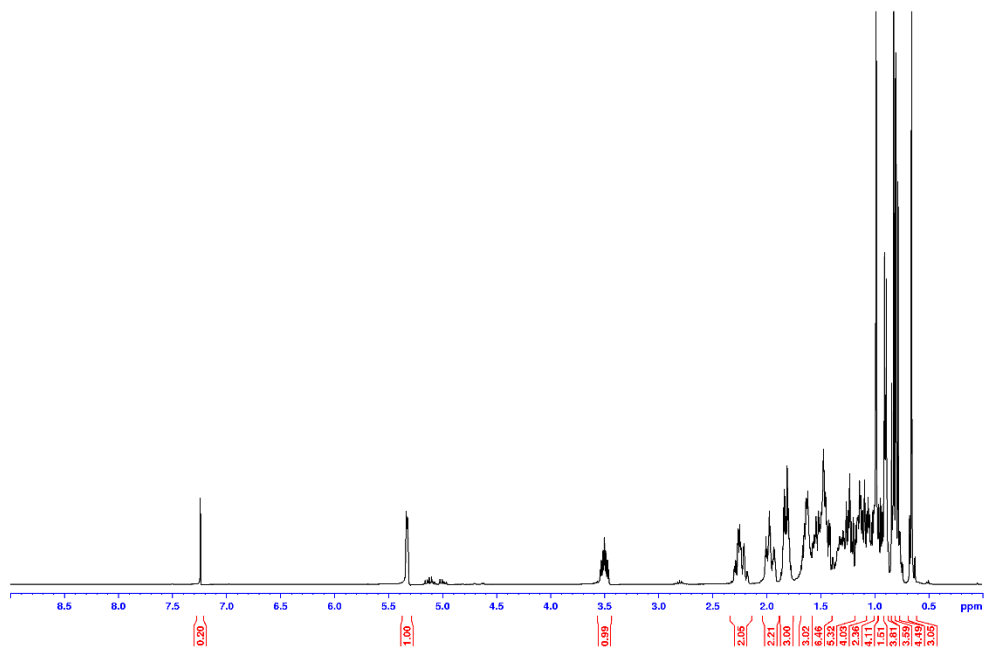
ภาพประกอบ 40 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 11



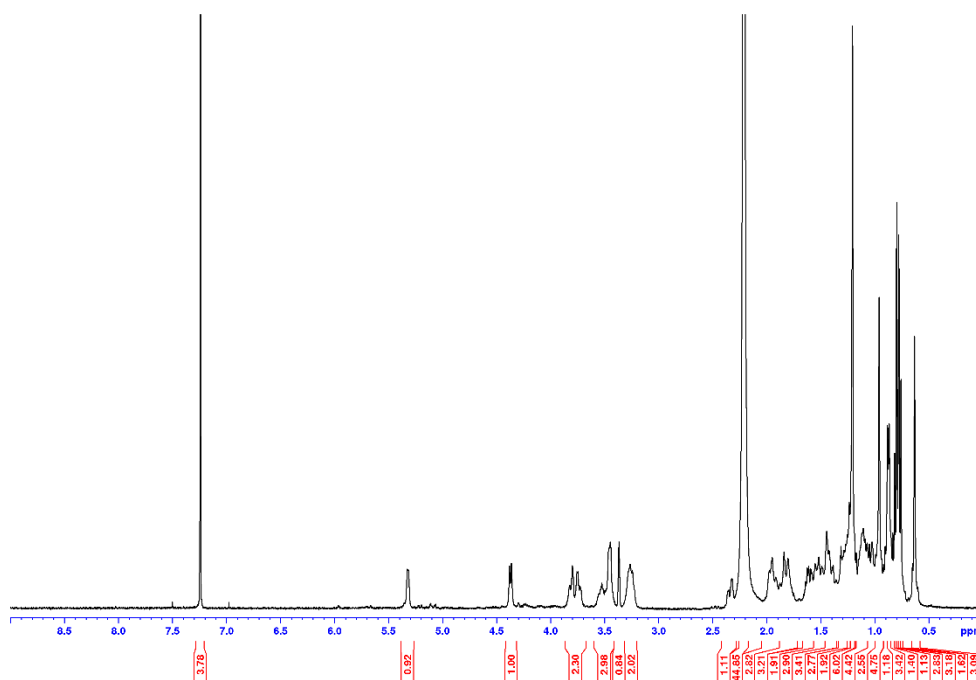
ภาพประกอบ 41 ^1H -NMR spectrum ของสารประกอบ EH 12



ภาพประกอบ 42 J -modulated ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ EH 12



ภาพประกอบ 43 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 13



ภาพประกอบ 44 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ EH 14

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางมนนภา เทพสุด
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 29 กันยายน 2510
สถานที่เกิด	อำเภอราชเทวี จังหวัดกรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 2/8 ซอยวิภาวดีรังสิต 54 ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาเคมี
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิชาศึกษาทั่วไป มหาวิทยาลัยศรีปทุม
ประวัติการศึกษา	
	พ.ศ.2533 วทบ.จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง
	พ.ศ.2538 วทม.จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง