การแยกและวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบจากรากโลดทะนง (ขาว)

(Isolation and Analysis of Compound Structures from Root of *Trigonostemon redioides* (Kurz) Craib, White)

สุภาวดี ภักดีนุกูลกิจจา* อัจฉรา แก้วน้อย*

*สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ซอยอิสรภาพ 15 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ วิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบที่แยกได้จากรากโลดทะนง (ขาว) *Trigonostemon redioides* (Kurz) Craib (White) สารสกัดเมทานอลของโลดทะนงขาวถูกทำการแยกโดยใช้ เทคนิคโครมาโทกราฟี ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารที่แยกได้โดยวิธีทางกายภาพและวิธีทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ IR, MS, 1D, 2D NMR ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกสารประกอบทางเคมีได้ 5 ชนิด คือ rediocide A **(1),** rediocideB **(2),** rediocide C **(3),** (+)-syringaresinol **(4)** และ coumarin tomentin (5) โดย (+)-syringaresinol (4) มีลักษณะเป็นผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 173-174 องศาเซลเซียส และ coumarin tomentin **(5)** 5-hydroxyl-6,7-dimethoxycoumarin มีจุดหลอมเหลวที่ 185-186 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

คำสำคัญ: *Trigonostemon reidioides*/ เรดิโอไซด์

Abstract

The purposes of this research were to structure elucidation of compounds isolated from the roots of *Trigonostemon redioides* (Kurz) Craib (White). The methanol extracted of *T. redioides* (Kurz) Craib (White) was separated by chromatography technique. The isolated compounds were identified by physical and spectroscopic methods: IR, MS, 1D and 2D NMR techniques. The results showed five substances could be separated by column chromatography and UV spectroscopy. Five substances were rediocide A (1), rediocide B (2), rediocide C (3), (+)-syringaresinol (4) and coumarin tomentin (5). (+)-Syringaresinol (4) was in a crystal form with a melting point of 173 to 174 °C and coumarin tomentin (5) (5-hydroxyl-6, 7-dimethoxy coumarin) with a melting point of 185 to 186 °C.

Keywords: *Trigonostemon reidioides*/ Rediocide

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่แถบเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ ภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อน อุณหภูมิร้อนชื้น มีทะเลลมและฝนเป็นปัจจัยให้เกิดป่าที่อุดมไปด้วยพันธุ์ไม้เขตร้อนที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งนับว่าเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ด้วยอาหาร และทรัพยากรที่สำคัญแห่งหนึ่งของทวีปเอเชียคนไทยจึงมีพืชผักมีประโยชน์ต่อร่างกายให้เลือกบริโภคมากมาย คนรุ่นก่อนๆรู้จักเลือกพืชปรุงเป็นอาหารและยารักษาโรคทำให้มีสุขภาพแข็งแรงต้านทานโรคจนอายุยืนยาว การพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อใช้ผลิตเป็นยาจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศอีกทางหนึ่ง เพราะสามารถทำการศึกษาจนพบว่าสมุนไพรตัวใดมีผลการศึกษาวิจัยที่ได้รับการยอมรับให้มีการนำไปพัฒนาจนสามารถผลิตเป็นยาใช้รักษาโรคได้จะส่งผลให้สมุนไพรชนิดนั้นเปลี่ยนสถานภาพจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านธรรมดาทั่วไปให้เปลี่ยนสภาพกลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถลดการนำเข้าสารตั้งต้นในการผลิตยาได้แม้ว่าจะเป็นเพียงการช่วยลดจำนวนการนำเข้าได้เพียงบางส่วน จากการศึกษาและคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า โลดทะนงเป็นสมุนไพรที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่ปลูกง่ายสามารถหาได้ทั่วไปในเขตป่าเบญจพรรณร้อนชื้นของไทยทั้งยังมีสรรพคุณที่หลากหลาย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขั้นตอนในการแยกสารบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรและวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญทางรากโลดทะนงขาว พร้อมทั้งแยกและวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบจากรากโลดทะนงขาว

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บสมุนไพรส่วนรากโลดทะนง (ขาว) จังหวัดเพชรบุรี นำส่วนรากมาทำความสะอาด ทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการย่อยรากโลดทะนง (ขาว) เป็นท่อนขนาดเล็กเพื่อนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำการชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของรากโลดทะนง (ขาว) หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) ด้วยสารละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เมทานอล ตามลำดับ

2. การแยกสารองค์ประกอบจากสารสกัดสมุนไพร ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.1 เลือกสารสกัดจากส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน(จากการศึกษาผลงานวิจัยที่ผ่านมา) แยกสารองค์ประกอบจากสารสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.2 เตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยการผสมซิลิกาเจลเข้ากับตัวทำละลายซึ่งมีความมีขั้วน้อยกว่าสารสกัดที่จะใช้ในการแยก จากนั้นเทลงในคอลัมน์ซึ่งบริเวณปลายคอลัมน์ถูกอุดด้วยสำลีเหนือบริเวณก๊อกเปิด-ปิด เพื่อทำการปรับพื้นผิวหน้าซิลิกาเจลให้เรียบจากนั้นทำการปรับระดับตัวทำละลายให้สูงเหนือซิลิกาเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

2.3 นำสารสกัดไดคลอโรมีเทนซึ่งเป็นส่วนสกัดที่มีร้อยละของสารสกัดมากที่สุดมาทำการละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

2.4 ชั่งซิลิกาเจลจำนวน 600 กรัม เทลงในสารตัวอย่าง ทำการคนให้ซิลิกาเจลและสารตัวอย่างเข้าเป็นเนื้อจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุนจนแห้งเป็นผง

2.5 เทสารตัวอย่างที่แห้งลงในคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ทำการเตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นทำการเกลี่ยสารตัวอย่างให้พื้นผิวเรียบเป็นหน้าเดียวกัน เททับด้วยซิลิกาเจลให้มีความสูงเหนือสารตัวอย่างประมาณ 1 นิ้ว ทำการเกลี่ยสารตัวอย่างให้ผิวหน้าซิลิกาเจล เรียบ

2.6 ทำการสกัดสารตัวอย่างโดยให้ตัวทำละลายเฮกเซนเคลื่อนผ่านชั้นซิลิกาเจลและสารตัวอย่างโดยค่อยๆเปิดก๊อกให้ตัวทำละลายไหลผ่าน โดยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์โดยใช้ส่วนผสมของระบบตัวทำละลายแบบเกรเดียนต์อีลูชัน (Gradient elution) สำหรับการเปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ควรเป็นไปตามลำดับส่วนจากเฮกเซน ต่อ ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 100:0 จากนั้นเพิ่มความมีขั้วของสารละลายขึ้นร้อยละ 5 เป็นอัตราส่วนเฮกเซน ต่อ ไดคลอโรมีเทน 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15 ,..จนถึงอัตราส่วนเฮกเซน ต่อ ไดคลอโรมีเทนเท่ากับ 0 : 100 แล้วจึงเพิ่มความมีขั้วต่อโดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทน ต่อ เมทานอลในอัตราส่วน 100 : 0, 95 : 5, 90 : 10,....จนถึงอัตรา ส่วนไดคลอโรมีเทน : เมทานอลเท่ากับ 0 : 10 โดยทำการเก็บส่วนสกัดในช่วงต่างๆ ช่วงละ100 มิลลิลิตร

2.7 จากนั้นทำการไล่ระบบโดยการใช้ 100 % สารละลายเมทานอล

2.8 นำส่วนต่างๆที่แยกได้ (ช่วงละ 100 มิลลิลิตรเรียงจากความมีขั้วต่ำไปหาความมีขั้วสูง) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศให้เหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายเข้มข้นที่ได้ในขวดเก็บสารตัวอย่าง (Vial) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3. การตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

3.1 สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาทำการจุดโดยจุดเว้นทีละ 10 ตัวอย่าง

3.2 จุดสารโดยใช้หลอดแคปปิลลารีขนาดเล็ก จุ่มลงในสารละลาย แล้วจุดลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ ทำการจุดสารซ้ำจุดละ 5 ครั้ง ทำเช่นนี้กับสารทุกความเข้มข้นเพื่อให้ได้จุดสารที่เท่ากัน ปล่อยแผ่น TLC ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

3.3 นำแผ่น TLC ที่เตรียมได้หาวัฏภาคเคลื่อนที่โดยระบบปิด ไล่ความมีขั้วของสารละลายจากสารละลายที่มีขั้วต่ำไปหาสารละลายที่มีขั้วสูงขึ้น

3.4 นำแผ่น TLC ออกมาจากระบบทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้ไปตรวจดูด้วยเครื่อง UV light ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตรโดยบันทึกผลที่อ่านได้ และทำการรวมสารละลายเข้าด้วยกันโดยพิจารณาจากสารตัวอย่างที่มีระยะทางการเคลื่อนที่หรือค่า R_f เท่ากันการเคลื่อนที่ที่เท่ากัน

3.5 นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้มากที่สุด หรือจนกว่าจะแห้งด้วยเครื่องด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน

3.6 เก็บส่วนสกัดเข้มข้นที่ได้ให้ผู้เชี่ยวชาญคัดเลือก เพื่อทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารต่อไปโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการสกัดรากโลดทะนง (ขาว)

เมื่อนำสารสกัดหยาบรากโลดทะนง (ขาว) ที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซนไดคลอโรมีเทน และเมทานอล มาคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ พบว่าปริมาณร้อยละของสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ค่าร้อยละของสารสกัด (%Yield) สูงที่สุด คือร้อยละ 0.300 รองลงมาคือสารสกัดไดคลอโรมีเทน คือร้อยละ 0.208 และ สารสกัดเฮกเซน คือร้อยละ 0.188 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณและร้อยละของสารสกัดหยาบและสีของสารละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ที่สกัดแยกได้จากรากโลดทะนง (ขาว)

ตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)
เฮกเซน	น้ำตาล	3.773	0.188
ไดคลอโรมีเทน	น้ำตาล	6.001	0.300
เมทานอล	น้ำตาล	4.170	0.208

การศึกษาการสกัดแยกสาระสำคัญจากรากโลดทะนง (ขาว) จำนวน 1 กิโลกรัมโดยวิธีมาเซอเรชันเลือกสารในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 6.001 กรัม มาทำการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโท กราฟีทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของสารละลายเฮกเซน : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่ 5 จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่6โดยเก็บทีละ 80 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นทีละ 10 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า R_f เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน นำสารสกัดที่แยกได้มาทำการระเหยสารทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จากนั้นนำสารที่ได้ทั้งหมดมาแยกสารที่น่าสนใจเพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อจำแนกและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างซึ่งผลจากการคัดเลือกสารที่น่าสนใจ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 6.001 กรัม ในแต่ละส่วนของสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากโลดทะนง (ขาว) ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

สารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่		ปริมาตร (มิลลิกรัม)	ลักษณะของสารสกัด
LTW 1	85%	Hexane : CH_2Cl_2	0.0053	สีขาวขุ่น
LTW 2	80%	Hexane : CH_2Cl_2	0.0024	สีเหลืองเข้ม
LTW 3	80%	Hexane : CH_2Cl_2	0.0136	สีเหลืองเข้ม
LTW 4*	100%	MeOH	0.0068	ผลึกสีขาว
LTW 5*	100%	MeOH	0.0040	ผลึกสีขาว
LTW 6*	100%	MeOH	0.0141	ผลึกสีขาว
LTW 7*	100%	MeOH	0.0088	ผลึกสีขาว
LTW 8*	100%	MeOH	0.0079	ผลึกสีขาว

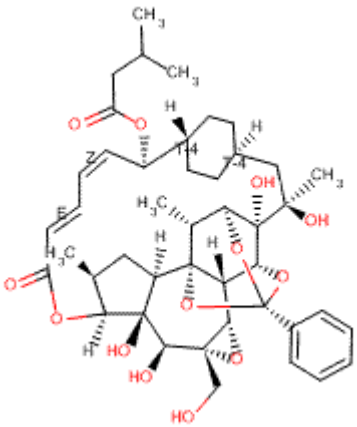
หมายเหตุ LTW แทน ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากโลดทะนงขาว

นำส่วนของสารสกัด LTW 1-LTW 8 คัดเลือกโดยผู้เชี่ยวชาญทำการคัดเลือกและตรวจสอบสารที่น่าสนใจ ปรากฏว่า LTW 4 , LTW 5, LTW6, LTW7 และ LTW 8 เป็นสารที่น่าสนใจ จึงนำLTW 4-LTW 8ไปทำสารให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Chromatography on silica gel(G 230-400 mesh)ทำให้ได้Fraction ของ Rediocide ก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Prep HPLC-ODS ด้วยร้อยละ 82 ของสารละลายเมทานอลในน้ำ ตรวจวัดที่ 260 nm พบสารสีขาวซึ่งประกอบด้วยสาร Daphnane diterpenoid และ Rediocide C จำนวน 0.780 มิลลิกรัม และสาร Rediocide A จำนวน6.875 มิลลิกรัมซึ่งตรงกับงานวิจัย (Tempeam, A, 2002; 2005) ที่มีการเผยแพร่งานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยสารทั้ง 5 ชนิด มีผลการวิจัยดังนี้

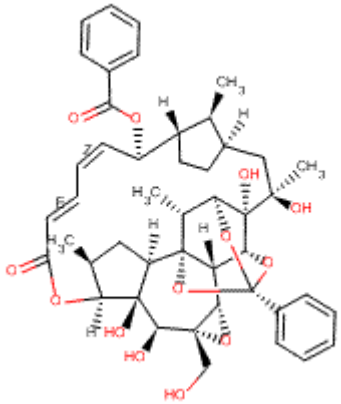
2. ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุล จากสารสกัดรากโลดทะนง (ขาว)

สารสกัดจากรากโลดทะนงแดง ถูกนำมาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี prep HPLC – ODS พบสารทั้งหมด 5 ตัว คือ reidioide B (1) และ reidioide C (2) และสารชนิดแรกที่พบ คือ reidioide A (3) และพบสารบริสุทธิ์ 2 ตัว คือ (+)-syringaresinol สารบริสุทธิ์ (4) และ Coumarin tomentin สารบริสุทธิ์ (5) จากข้อมูลผลทางสเปกโทสโกปีของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ที่แยกได้ แสดงผลดังนี้

Rediocide A, Rediocide B และ Rediocide C สามารถแยกสารสำคัญจาก LTW 4 – LTW 8 ได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีสเปกโทรสโกปี เครื่องฉาย (UV) และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ได้โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีที่ศึกษา ซึ่งได้แก่ MS (HRFABMS), 1D และ 2D NMR เทคนิค คือ COSY, NOESY, HMBC และ HMQC มาประกอบเป็นข้อมูลต่างๆ ดังนี้ วิธี HRFABMS ทำให้ทราบสูตรโครงสร้างขอสาร Rediocide B ว่ามีโครงสร้างเป็น $C_{46}H_{53}O_{13}$ ([M-H]$^-$ m/z มวลต่อประจุที่ 813.3484 มวลโมเลกุล โดย UV spectrum แสดงค่าการดูดกลืนแสง λ max ที่ 262 nm ตาม Dienoate moiety วิธีอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Hydroxyl (νmax 3562 cm^{-1}),และ 2 Ester carbonyl group (νmax 1717 และ 1683cm^{-1}) ของโมเลกุลสาร Rediocide B การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ ^{13}C NMR spectrum, ร่วมกับ DEPT experiment แสดงสัญญาณของ 2 ester carbonyl (δ_C164.8 และ 165.2), 2 phenyl groups,4 olefinic methines (δ_C124.9, 136.6, 129.6, 135.3) , ortho-ester carbon(δ_C 107.6), 5 oxygenated quaternary carbons (δ_C 80.9, 76.9, 76.0, 71.9, และ 62.0), oxygenated methylene (δ_C63.2) , 6 oxygyenated tertiary carbon (δ_C 84.6, 81.0, 80.3, 78.1, 70.6, and 64.0), 6 aliphatic methylenes (δ_C 42.9, 35.4, 33.3, 32.4, 31.2, 29.9), และ 3 methyl groups (δ_C 28.1, 19.3, 13.4) The proton-bearing carbons ใน ^{13}C NMR spectrum ที่ทำการทดลองด้วยวิธี HMQC



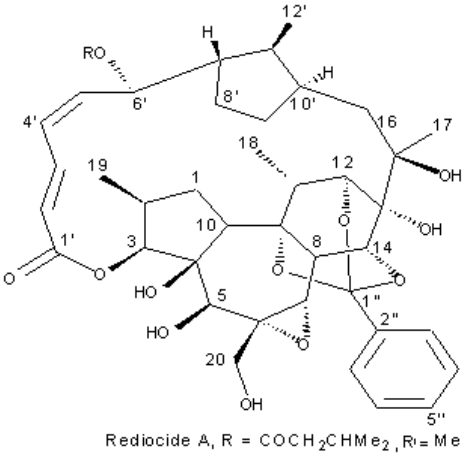
Rediocide B



Rediocide C

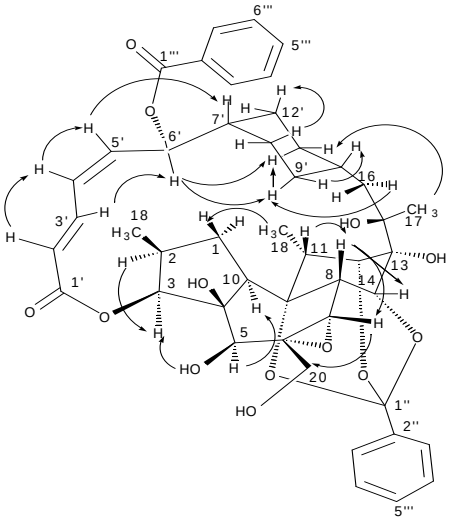
ภาพที่1 โครงสร้างสาร rediocide B และ C

ที่มา: Tempeam et al., 2005



ภาพที่ 2 โครงสร้างสาร rediocide A

ที่มา: Jayasuriya et. al., 2000



ภาพที่ 3 NOESY สาร rediocide B

ที่มา: Tempeam et. al., 2005

ข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H และ ^{13}C และ HMBC NMR จาก Rediocide B ที่มีการระบุไว้ในตารางที่ 3 และ 4 การทดสอบโดยวิธี HMQC และ COSY spectra ทำให้ทราบโครงสร้างสาร Rediocide B จากนั้นตรวจพบสาร 4 ตัวที่แยกได้จาก Rediocide A, Rediocide B มีโครงสร้าง (PS) ที่เหมือนกัน 4 ตัว คือ [(PS1) C10-C1-C2-C19-C3, (PS2) C11-C18, (PS3) C7-C8-C14, และ (PS5) C3′′-C7′′] และ โครงสร้าง 2 ตัวที่ต่างกันนั่นคือ [(PS4) C2′- C16 and (PS6) C2′′′-C7′′′] Benzoyl protons ที่แสดงออกมาที่ตำแหน่ง C2′′′-C7′′′ จะปรากฏสัญญาณใน ^{1}H NMR spectrum ที่ δ_H7.36 (2 H, m), δ_H 7.60 (1 H, m) และ δ_H 7.97 (2 H, dd, J=8.50, 1.4Hz) และสัญญาณใน ^{13}C NMR spectrum ที่ δ_c 128.7, 129.1, 129.5 และ 133.4 โดยใช้ข้อมูลจาก HMBC ช่วยในการเชื่อมโยงโครงสร้างStereochemistry ของ Rediocide B ได้จากการตรวจวัดด้วยวิธี J couplings, NOESY spectroscopy , ^{1}H NMR, COSY และ HMBC Spectra จะปรากฏให้เห็นความผิดปกติของ 12-carbon polyketide, 2E, 4Z-dodecadienoate โดยพิสูจน์ความสัมพันธ์ด้วยวิธีการทาง NOESY spectrum ของสาร Rediocide Bโดยพิจารณาจาก NOSEY spectrum (ภาพที่ 2), H-5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H-3 และ H-10, H-3 to H-2, และ H-10 to H-1α (1.72 ppm) ด้วยเหตุนี้จึงปรับโปรตอนเหล่านี้ไปวางในตำแหน่ง α-face, เป็นการสรุปโครงสร้างของ Daphnane stereochemistry

นอกจากนี้ β-face protons ยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1, 3-diaxial กับ H-8 และ H-11, H-8 ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์เกี่ยวโยงไป H-7 และ H-14 ด้วยเหตุนี้ตำแหน่งการจัดวาง H-14 จึงอยู่ในตำแหน่งเส้นศูนย์สูตรแกนของ H-11 จะแสดงความ สัมพันธ์ที่แข็งแรงต่อไปยัง H_3-18 และ H-12 ซึ่งอยู่แถบเส้นศูนย์สูตร วงแหวน 6 เหลี่ยมของ Daphnane จะถูกยึดอยู่ในวงล้อมที่เหมือนกันโดยกลุ่มเอสเตอร์-Ortho เชื่อมต่อกับ 1,3,5-triaxially ที่ C-9, C-12 และ C-14 ซึ่งจะเน้นไปที่ α face ของโมเลกุลความสัมพันธ์ที่แข็งแกร่งของ NOESY จาก H-5′ ไป H-7′ เช่นเดียวกับความ สัมพันธ์ของ H-6 ′ไป H-3 ′, H-9 α′ (δ H 0.9), และ H-11 α′ (δ H 1.47) และ H-10′ กับ H-8 β′ (δ H 2.1) จัดตั้ง stereochemistry ที่ C-5 ′, C-6 ′, C-7 ′และ C-10′ ดังแสดงในความสัมพันธ์ NOESY ต่อ H-9 α′ (δ H 0.9), H-11 α′ (δ H 1.47) และ H-16 α (δ H 1.12) แสดงให้เห็นว่าวงแหวน Macrocyclic พลิกกลับมาที่ด้านบนของแหวน Cyclohexyl ของ Diterpene

ตารางที่ 3 ^{13}C และ ^{1}H NMR spectral data ของสารบริสุทธิ์ **(4)** ใน $CDCl_3$ และ (+)-Syringaresinol

Position	Compound **4** δ_C [a]	(+)-syringaresinol δ_C [b]	Compound **4** δ_H, mult, J (H_Z) [a]	(+)-syringaresinol δ_H , mult, J (H_Z) [b]
C-1, 1′	132.2 (C)	132.2		
C-2, 2′, 6, 6′	104.8 (CH)	104.8	6.59, s	6.58, s
C-3, 3′, 5, 5′	149.3 (C)	149.3		
C-4, 4′	137.3 (C)	137.3		
C-7, 7′	86.6 (CH)	86.6	4.74, d, 4.3	4.73, d, 4
C-8,8′	55.0 (CH)	55.0	3.10, m	3.07, m
C-9,9′	72.4 (CH_2)	72.4	H-α, 3.91, dd, 9.1, 4.0 H-β, 4.29, dd, 9.1, 6.9	H-α, 3.80 - 3.99, m H-β, 4.16 – 4.42, m
-OMe	56.6 (CH_3)	56.6	3.90, s	3.89, s
-OH			5.56, s	

[a] Recorded at 100 MHz for ^{13}C and 400 MHz for ^{1}H in $CDCl_3$

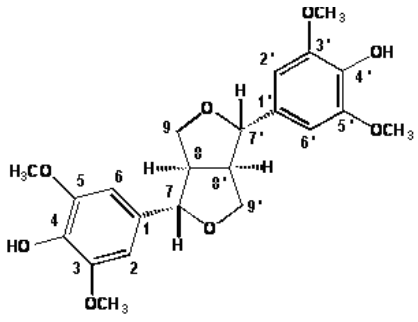
[b] Recorded at 60 MHz for ^{1}H in $CDCl_3$

สารบริสุทธิ์ (4) ได้จากการตกผลึกสาร (+)-Syringaresinol โดยใช้ตัวทำละลาย MeOH, จุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 173-174 องศาเซลเซียส โครงสร้างของสาร (+)-syringaresinol ถูกอธิบายด้วยวิธีทาง Spectroscopic ใช้วิธี EIMS เพื่อหาสูตรโมเลกุลของ (+)-syringaresinol มีสูตรคือ $C_{22}H_{26}O_8$ ซึ่งแสดงให้เห็นโมเลกุลไอออนที่ m/z 418, ที่ 10 องศา โดยทราบจากการทำ Unsatura tion

ข้อมูลจาก ^{13}C NMR และ DEPT สเปกตรัม (DEPT-90 และ DEPT-135) ของสารบริสุทธิ์ (4) (+)-syringaresinol ที่ 100 MHz แสดงให้เห็นสัญญาณ 8 สัญญาณ (ดังภาพที่ 4) แสดง 1 สัญญาณของ 2 methoxy carbons δ 56.6 (CH_3O),1 สัญญาณของ 2 Methylene carbons δ 72.4 (CH_2-9, 9′), 3 สัญญาณ ของ 6 Methine carbons δ 104.8 (CH-2, 2′, 6, 6′), δ 86.6 (CH-7, 7′), และ δ 55.0 (CH-8, 8′), และ 3 สัญญาณของ 8 Quaternary carbons δ 132.2 (C-1, 1′), δ 149.3 (C-3, 3′, 5, 5′), และ δ 137.3 (C-4, 4′) (แสดงดังตารางที่ 3)

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ของสารสารบริสุทธิ์ (4) (+)-syringaresinol ที่ 400 MHz แสดง 3 สัญญาณที่ δ 6.95 (s, 2H, CH-2, 2′, 6, 6′), δ 3.90 (s, 12H, O-CH_3) และ δ 5.56 (s, 2H, OH), หนึ่ง Doublet ที่ δ 4.74 (d, 2H, J = 4.3 Hz, CH-7, 7′), และ 2 ชุดของ Doublet ของ doublet ที่ δ 3.91 (dd, 2H, J = 9.1, 4.0 Hz, H-α-9, 9′) และ δ 3.91 (dd, 2, J = 9.1, 6.9 Hz, H-β-9, 9′),แสดงการปรากฏของ 2 โปรตอนที่ไม่สมมาตร ที่ C-9 และ C-9′ (แสดงดังตารางที่ 3) ความสัมพันธ์ของโปรตอนเหล่านี้ถูกนำไปใช้ในข้อมูลสเปกตรัม COSY

จากข้อมูลพื้นฐานของสาร (+)-Syringaresinol โดยการเปรียบเทียบข้อมูลจาก ^{1}H และ ^{13}C NMR (+)-syringaresinol แสดงดังตารางที่ 3 โครงสร้างของสาร (+)-syringaresinol ถูกระบุว่าเป็น (+)-Syringaresinol โดยมีงานวิจัย (Tempeam et al., 2005) รายงานไว้แล้วว่า จุดหลอมเหลวของสาร (+)-Syringaresinol ที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้คือ 173-174 องศาเซลเซียส



ภาพที่ ngaresinol

ที่มา: (Chen, 2011)

ตารางที่ 4 ^{13}C แ umarin tomentin

สารบริสุทธิ์ **(5)** ที่แยกได้มีลักษณะ δ 56.2 (CH_3O-6) และ δ 61.3 (CH_3O-7), 3

Position	δ_C	δ_H, mult, J (H_Z)	HMBC
2	161.5 (C)		C-2 ↔ H-4
3	111.7 (CH)	6.25, d, 7.7	
4	138.6 (CH)	7.98, d, 7.7	C-4 ↔H-8
4a	102.6 (C)		C-4a ↔ H-3, 4, 8
5	145.7 (C)		C-5 ↔ H-4, 8, OH
6	131.6 (C)		C-6 ↔ H-8, 6-OCH_3
7	155.6 (C)		C-7 ↔ H-8, 7-OCH_3
8	92.3 (CH)	6.46, s	C-8 ↔ H-4, 7-OCH_3
8a	151.7 (C)		C-8a ↔ H-4, 8
6-OCH_3	56.2 (CH_3)	3.90, s	
7-OCH_3	61.3 (CH_3)	3.92, s	
5-OH		6.38, s	

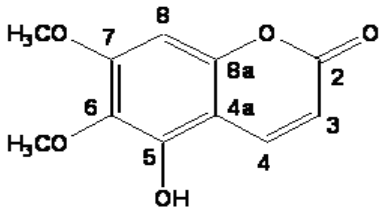
คล้ายแท่งเข็มหรือปริซึม, มีจุดหลอมเหลวที่ 185-186 องศาเซลเซียส โครงสร้าง สารบริสุทธิ์ **(5)** Coumarin tomentin ถูกอธิบายด้วยวิธีทาง Spectroscopic ใช้วิธี EIMS เพื่อหาสูตรโมเลกุลของCoumarin tomentin มีสูตรโมเลกุลดังนี้ $C_{11}H_{10}O_5$ ซึ่งจะแสดงโมเลกุลไอออนที่ m/z 222 ที่ 7 องศาเซลเซียส จากการทำ Unsaturations

ข้อมูลจาก ^{13}C NMR และ DEPT สเปกตรัม (DEPT-90 และ DEPT-135 แสดงผลดังตารางที่ 4) สารบริสุทธิ์ (5) Coumarin tomentin ที่ 100 MHz แสดงให้ เห็นสัญญาณ 11 สัญญาณ เห็น 2 Methoxy carbons Methine carbons δ 138.6 (CH-4), δ 111.7 (CH-3), และ δ 92.3 (CH-8), และ 6 Quaternary carbons δ 161.5 (C-2), δ 155.6 (C-7), δ 145.7 (C-5), δ 131.6 (C-6), δ 151.7 (C-8a) และ δ 102.6

ข้อมูลจาก ^1H NMR สารบริสุทธิ์ (5) Coumarin tomentin ที่ 400 MHz แสดงให้เห็น 2 สัญญาณ ที่ δ 7.98 (J = 7.7) และ δ 6.25 (J = 7.7) แสดงให้เห็นพันธะคู่ระหว่าง C-3 และ C-4นอกจากนี้ยังมี 4 Singlets ของ Methoxy 2 กลุ่ม ขึ้นที่ตำแหน่งδ 3.92 และ δ 3.90 และโปรตอนที่เป็นวงแหวนเบนซิน ขึ้นที่ตำแหน่ง δ 6.46 (CH-8) และ Hydroxyl group ขึ้นที่ δ 6.38 (5-OH) (แสดงดังตารางที่ 4) นำข้อมูล

เหล่านี้มาหาความ สัมพันธ์โดยวิธี HMBC ความสัมพันธ์ของโปรตอนเหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์โดย COSY Spectral data การเชื่อมต่อของพันธะระหว่าง C-H จากวิธี HMQC NMR spectral data โดยวิธี HMQC NMR spectral data ของสาร Coumarin tomentin นี้พบการเชื่อมต่อกันของ C-H 2-3 พันธะ แสดงดังภาพที่ 5

บนข้อมูลพื้นฐานของสาร Coumarin tomentin และจากการเปรียบเทียบข้อมูลจาก ^{1}H และ ^{13}C NMR กับสาร Scopoletin (Aldrich 24658-1) ทำให้ทราบว่าโครงสร้างสารคือ Coumarin tomentin หรือ 5-hydroxyl-6,7-dimethoxycoumarin โดยมีงานวิจัย (Tempeam et al., 2005) รายงานไว้แล้วว่า จุดหลอมเหลวของสาร (+)-Syringaresinol ที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้คือ 185-186 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 5 โครงสร้างสาร Coumarin tomentin
ที่มา: (Chen, 2011)

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยเรื่องการสกัดรากโลดทะนงขาว [*Trigonostemon redioides* (Kerz) Craib (white)] จากจังหวัดเพชรบุรี น้ำหนัก 1.00 กิโลกรัมสกัดด้วยวิธี Maceration โดยใช้สารละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ พบว่าสารสกัดโลดทะนงในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนให้ร้อยละของสารสกัดสูงที่สุดคือร้อยละ 0.300 รองลงมาคือ สารสกัดโลดทะนงในตัวทำละลายเมทานอล คือ ร้อยละ 0.208 และสารสกัดโลดทะนงในตัวทำละลายเฮกเซนเท่ากับร้อยละ 0.188 ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดโลดทะนงในตัวทำละลายเมทานอลมาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบสาร 5 ชนิดจากนั้นนำสารที่พบทั้ง 5 ชนิดไปทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี สเปกโทรสโกปี เครื่องฉาย (UV) และพิสูจน์โครงสร้างของสารใหม่โดยอาศัยข้อมูลทางสเปก โทรสโกปี ซึ่งได้แก่ IR,MS (HRFABMS), 1D และ 2D NMR เทคนิค คือ COSY , NOESY , HMBC และ HMQC ทำให้ทราบสารทั้ง 5 ชนิด คือ Rediocide A, Rediocide B, Rediocide C, สารบริสุทธิ์ (4) คือ (+)-Syringaresinol สารที่พบมีลักษณะเป็น

ผลึก มีจุดหลอมเหลวที่ 173-174 องศาเซลเซียส, สารบริสุทธิ์ (5) คือ Coumarin tomentin หรือ 5-hydroxyl-6,7-dimethoxycou-Marin มีจุดหลอม เหลวที่ 185-186 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

Chen, Y.G., Wub, J.C., Chena, G.Y., Hana, C.R., and Songa, X.P. (2011). Chemical constituents of plants from the Genus Trigonostemon. **Chemistry & Biodiversity,** 8: 1958-1967.

Jayasuriya, H., Zink, D. L., Singh SB, et al. (2000). Structure and of Rediocides A, a highly modifileddaphnane from *Trigonostemon reidioides* exhibiting potent insecticidal activity. **J. Am. Chem. Soc**., 122: 4998-4999.

Tempeam A., Thasana N., Dawornkricharut A., Pavaro C., RuchirawatS. (2002). In vitro cytotoxicity of some Thai medicinal plants and daphnane diterpenoid from *Trigonostemon reidioides*. **Mahidol U. J. Pharm. Sci**., 29(3-4), 25-31.

Tempeam, A., Thasana, N., Pavaro, C., Chuakul, W., Siripong, P., and Ruchirawat, S. (2005). A new cytotoxic daphnane diterpenoid, rediocide G, from *Trigonostemon reidioides*. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, 53(10), 1321-1323.