การแยกและวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบจากรากโลดทะนง (แดง) (Isolation and Structure Elucidation of Compounds from Root of *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib, Red)

ระวีวรรณ กลิ่นทิพย์[*] อัจฉรา แก้วน้อย[*]

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

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารประกอบทางเคมีในสารสกัดจากรากของต้นโลดทะนง (แดง) *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib (Red) โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ได้โดยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ^{13}C , ^{1}H NMR NOESY และ HMBC ผลการวิจัยพบสารสำคัญ 5 ชนิดจากรากของต้นโลดทะนง (แดง) คือ rediocide A **(3)**, rediocide B **(1),** rediocide C **(2)**, (+)-syringaresinol **(4)** และ scopoletin **(5)** โดยโครงสร้างของสารนี้ถูกแยกและเปรียบเทียบกับ NMR และข้อมูลที่ได้จากแมสสเปคตรัมของ rediocides ตัวก่อนหน้านี้ และยืนยันผลโดย 2D NMR สเปคตรัม พบว่า (+)-syringaresinol มีจุดหลอมเหลวที่ 173 - 174 องศาเซลเซียส และ scopoletin มีจุดหลอมเหลวที่ 204 - 205 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ: *Trigonostemon reidioides*/ Rediocide/ (+)-Syringaresinol/ Scopoletin

Abstract

The purposes of this research were to isolate and purify the main component from root of Lodthanong (Red), *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib (Red), by chromatographic separation. The isolated compounds were identified by physical and spectroscopic methods (^{13}C , ^{1}H NMR NOESY and HMBC). The isolated compounds were identified as 5 chemical substances; rediocide A **(3)**, rediocide B **(1)**, rediocide C **(2)**, (+)-syringaresinol **(4)** and scopoletin **(5)**. The structures were elucidated by comparison of its NMR and mass spectral data with those of previously known rediocides and confirmed by extensive 2D NMR spectral analysis. The results showed that melting point of (+)-syringaresinol was 173-174 ^{o}C and scopoletin was 204-205 ^{o}C.

Keywords: *Trigonostemon reidioides*/ Rediocide/ (+)-Syringaresinol/ Scopoletin

บทนำ

ปัจจุบันสมุนไพรในประเทศไทยนับเป็นที่นิยมและเริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในชีวิตประจำวัน เนื่องจากประชาชนหันมาให้ความสนใจพืชสมุนไพรและทรัพยากรในประเทศมากยิ่งขึ้น โดยมีการนำสมุนไพรไปใช้ในการบำบัดรักษาโรคและใช้ในการยับยั้งการเกิดพิษต่างๆ มากมาย เพราะในพืชสมุนไพรนั้นมีสารสำคัญหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ อีกทั้งสมุนไพรเหล่านี้ยังปลูกได้เองและหาได้ง่ายตามฤดูกาล ดังนั้นการค้นพบสารเคมีจากสมุนไพรจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้เกิดการพัฒนาการศึกษาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในส่วนต่างๆ ของสมุนไพรมาอย่างต่อเนื่อง

โลดทะนงแดง หรือ *Trigonostemon reidioides* Craib เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มีการนำมาศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง ลักษณะของโลดทะนงแดงจะเจริญงอกงามในฤดูฝน ฤดูแล้ง ต้นมักตายแล้วเกิดหน่อใหม่ เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนจะพบได้ตามป่าเบญจพรรณแล้งที่ระดับความสูงไม่เกิน 500 เมตร และมีการนำโลดทะนงแดงมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแก้พิษต่างๆ อาทิ เช่น นำรากมาฝนกับน้ำกิน ทำให้อาเจียน เพื่อถอนพิษคนกินยาเบื่อ เมาพิษเห็ดและหอย แก้เสมหะเป็นพิษ แก้หืด เป็นยาระบาย ฝนเกลื่อนฝี หรือดูดหนองถ้าฝีแตก แก้ฟกช้ำเคล็ดบวม รากผสมกับเมล็ดหมาก ฝนน้ำกินและผสมกับน้ำมะนาวทาแผลแก้พิษงูที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท นำมาต้มน้ำดื่มทำให้อาเจียนแก้พิษ แก้เบื่อเมา หรือฝนน้ำกินช่วยให้เลิกดื่มเหล้า เป็นต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการค้นพบสารประกอบต่างๆ ในโลดทะนงแดง ได้แก่ กลุ่ม novel flavonoidal indole alkaloid ซึ่งประกอบด้วย afzelechin – (4$\alpha \rightarrow$8) – afzelechin, trigonostemone, phenanthrenone, lotthanongine, daphnane

diterpenoid (rediocide A), daphnane diterpenes (rediocides B-F และ rediocide G) รวมทั้งได้นำสารที่ค้นพบเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้รากโลดทะนงแดงมาทำการศึกษาโดยแยกสกัดสารประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในรากโลดทะนงแดง แล้วทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสำคัญที่มีอยู่โดยทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ผลที่ได้จากการวิจัยนี้จะสามารถนำมาใช้ศึกษาสารประกอบในพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆได้อีกต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

1.1 นำพืชสมุนไพรรากโลดทะนงแดงส่งให้ผู้เชี่ยวชาญทำการตรวจสอบ

1.2 นำรากโลดทะนงแดงที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จึงนำไปบดด้วยเครื่องบด จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธี ซีเควนเชียล (Sequential extraction)

2. การศึกษาการสกัดตัวอย่างสมุนไพร

นำผงของรากโลดทะนงแดงที่บดละเอียดแล้วมาทำการสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (maceration) โดยการเติมตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล หลังจากนั้นกรองสารสกัด แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน เก็บสารไว้ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ต่อไป

3. การศึกษาการแยกองค์ประกอบจากสารสกัดสมุนไพร

3.1 นำสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากโลดทะนงแดงมาละลายด้วยไดคลอโร-มีเทนจากนั้นเติมซิลิกาเจล โดยใช้ปริมาณ 2 เท่าของสารตัวอย่างลงในขวดสารตัวอย่างเขย่าให้เข้ากัน

3.2 นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายจนแห้งเป็นผง

3.3 เตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยการผสมซิลิกาเจลกับตัวทำละลายซึ่งมีขั้วน้อยกว่าสารสกัดที่จะใช้แล้วเทลงในคอลัมน์ ซึ่งปลายคอลัมน์ถูกอุดด้วยสำลีที่บริเวณเหนือก๊อกปิดเปิด จากนั้นทำหน้าซิลิกาเจลให้เรียบ และ ทำการปล่อยระดับของตัวทำละลายให้เหลืออยู่เหนือซิลิกาเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

3.4 นำสารสกัดในโลดทะนงมาทำการโหลดลงบนคอลัมน์โครมาโทรกราฟีที่เตรียมไว้ แล้วทำการโรยซิลิกาเจลทับอีกทีให้สูงพอประมาณจึงค่อยเติมตัวทำลายลงไป

3.5 ปล่อยให้สารละลายตัวอย่างเคลื่อนผ่านชั้นซิลิกาเจลโดยค่อยๆ เปิดก๊อกและทำการเก็บส่วนต่าง ๆ (fraction) ทุก ๆ 100 มิลลิลิตร ทำการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์ โดยใช้ส่วนผสมของระบบตัวทำละลายแบบเกรเดียนต์อีลูชัน (gradient elution) สำหรับการเปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ควรเป็นไปตามลำดับส่วนจาก

100 : 0 แล้วทำการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของสารขึ้นร้อยละ 5 จนถึงอัตราส่วน 0 : 100

3.6 นำส่วนต่าง ๆ (fraction) ที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) และเก็บในขวดเก็บสารตัวอย่าง (vial) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

4. การตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นของส่วนต่าง ๆ (fraction) ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

4.1 หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารแต่ละชนิดจากส่วนต่าง ๆ (fraction)

4.2 นำแต่ละส่วนต่าง ๆ (fraction) มาทำการจุดให้ชัดเจนลงบนแผ่น TLC โดยห่าง
จากขอบล่างแผ่นประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วแช่ลงในระบบ

4.3 นำออกมาจากระบบ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ไปตรวจดูด้วยแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร

4.4 ทำการรวมแต่ละส่วนต่าง ๆ (fraction) ที่ให้แถบการแยกเหมือนกันเข้าด้วยกันแล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นจึงทำแต่ละส่วนต่าง ๆ (fraction) ให้แห้งสนิทด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ (freeze dryer) อีกครั้งหนึ่ง

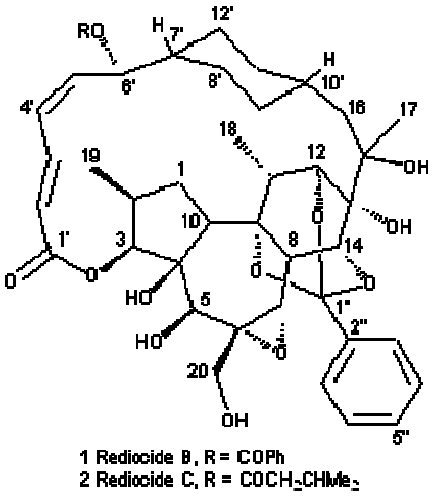
4.5 เก็บส่วนต่างๆ (fraction) ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารต่อไปโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

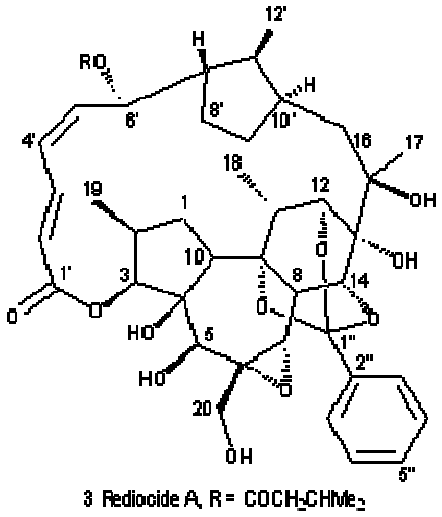
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การศึกษาข้อมูลงานวิจัยจะพบว่าการเลือกสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากโลดทะนง จะพบสารในกลุ่ม reidioides ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากโลดทะนง มาทำการวิจัย

ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุล จากสารสกัดรากโลดทะนงแดง

สารสกัดจากรากโลดทะนงแดง ถูกนำมาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิการเจล ที่มีขนาด 230 - 400 mesh โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ได้สาร 22.88 มิลลิกรัม ของ fraction ที่ 6 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี prep HPLC – ODS พบสาร สารประกอบที่เป็นผงสีขาวที่ประกอบไปด้วย daphnane diterpenoids คือ reidioide B **(1)** และ reidioide C **(2)** และสารชนิดแรกที่พบ คือ reidioide A **(3)** และพบสารบริสุทธิ์ใหม่ 2 ชนิด คือ (+)-syringaresinol Compound **(4)** และ scopoletin สารบริสุทธิ์ที่ **5** จากข้อมูลผลทางสเปกโทสโกปีของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ที่แยกได้ แสดงผลดังนี้





ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ rediocide A, B และ C

จากภาพที่ 1 แสดง HRFABMS ของ reidioide B มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{46}H_{53}O_{13}$ ($[M-H]^-$ *m/z* มวลต่อประจุ 813.3484, คำนวณ 813.3486) การดูดกลืนแสงพบว่า UV spectrum ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร เมื่อตรวจสอบด้วย IR spectrum แสดงการดูดกลืนแสง ของ hydroxyl (υ_{max} 3562 cm^{-1}) และ 2 ester carbonyl groups (υ_{max} 1717 และ 1683 cm^{-1}) ในโมเลกุลของ rediocide B การวิเคราะห์โดยใช้ ^{13}C NMR spectrum และการทำ DEPT ในการทดลอง พบสัญญาณของ 2 ester carbonyls (δ_C 164.8 และ 165.2), 2 phenyl groups, 4 olefinic methines (δ_C 124.9, 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_C 63.2), 6 oxygenated tertiary carbons (δ_C 84.6, 81.0, 80.3, 78.1, 70.6 และ 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) โปรตอนที่ต่อกับคาร์บอนใช้ ^{13}C NMR spectrum และ HMQC

ข้อมูลจาก ^{1}H , ^{13}C และ HMBC NMR spectrum ของ rediocide B **(1)** ซึ่ง HMQC และ COSY spectrum ทำให้ทราบว่า compound 1 คือ rediocide B เป็นอนุพันธุ์ของ rediocide A (3) Rediocide B (1) พบมี partial substructures (PS) เหมือน rediocide A (3) [(PS1) C10 - C1 - C2 - C19 -C3, (PS2) C11 -C18, (PS3) C7 - C8 - C14, และ(PS5) C3′′-C7′′] และแตกต่างอยู่สอง partial substructures (PS4) C2′-C16 และ (PS6) C2′′′-C7′′′] ส่วนที่ C2′′′-C7′′′] คือ แสดงโปรตอนของหมู่ benzoyl จาก ^{1}H NMR spectrum แสดงสัญญาณที่ δ_H 7.36 (2H, m), δ_H 7.6 (1H, m) และ δ_H 7.97 (2H,

dd, J = 8.5, 1.4 Hz) และ ^{13}C NMR spectrum แสดงสัญญาณที่ δ_C 128.7, 129.1, 129.5 และ 133.4 เป็นความสัมพันธ์ของ partial substructures ที่อยู่ติดรวมกัน ซึ่งถูกกำหนดโดยการทดสอบ HMBC

Rediocide C (2) ถูกแยกออกเป็นของแข็งไม่มีสี HRFABMS ของ Rediocide C (2) มีสูตรโมเลกุล $C_{44}H_{58}O_{13}$ (มีสูตรโมเลกุลเชิงไอออน *m/z* = 793.3799, วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลได้ 793.3799) วัดค่าการดูดกลืนแสง พบในช่วง λ_{max} 262 nm ที่สอดคล้องกับ dienoate moiety แถบแสงแยกสี IR ที่แสดงแถบให้การดูดซึมสำหรับ hydroxyl (υ_{max} 3566 cm^{-1}) และ หมู่ ester carbonyl สอง กลุ่ม (υ_{max} 1717 and 1690 cm^{-1}) ในโมเลกุลของ Rediocide C (2)

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR spectrum ของ rediocide C (2) ให้โครงสร้างบางส่วนเกือบเหมือนกับ rediocides A[2] (3) และ B (1) แสดงให้เห็นโครงสร้างบางส่วน [(PS1) C10-C1-C2-C19-C3, (PS2) C11-C18, (PS3) C7-C8-C14, (PS5) C3″-C7″ และ (PS6) C2‴-C7‴] ซึ่งคล้ายกับ ของ rediocide A 3 และ (PS4) C2′-C16 ก็เหมือนกับ redioside B (1) การเชื่อมต่อของโครงสร้างบางส่วน (PS1- 6) ด้วยกัน และส่วนที่เหลือของโมเลกุลก็พิสูจน์โดยการทดลอง HMBC

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล ^{13}C, ^{1}H และ HMBC NMR spectral ของ compound **(4)** ใน $CDCl_3$

Position	δ_C	δ_H, mult, J (H_Z)	HMBC
C-1, 1′	132.2 (C)		C-1, 1′ ↔ H-2, 2′, 6, 6′, 7, 7′, 8, 8′
C-2, 2′, 6, 6′	104.8 (CH)	6.59, s	C-2, 2′, 6, 6′ ↔ H-2, 2′, 6, 6′, 7, 7′, OMe
C-3, 3′, 5, 5′	149.3 (C)		C-3, 3′, 5, 5′ ↔ H-2, 2′, 6, 6′, OMe, OH
C-4, 4′	137.3 (C)		C-4, 4′ ↔ OH, OMe
C-7, 7′	86.6 (CH)	4.74, d, 4.3	C-7, 7′ ↔ H-2, 2′, 6, 6′, 8, 8′, H-α-9,9′, H-β -9,9′
C-8, 8′	55.0 (CH)	3.10, m	C-8, 8′ ↔ H- 7, 7′, 8, 8′, H-α-9, 9′, H-β -9,9′
C-9, 9′	72.4 (CH_2)	H-α, 3.91, dd, 9.1, 4.0 H-β , 4.29, dd, 9.1, 6.9	C-9, 9′ ↔ H- 7, 7′
-OMe	56.6 (CH_3)	3.90, s	
-OH		5.56, s	

[a] ^{13}C วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 100 MHz และ ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 400 MHz ใน $CDCl_3$

[b] ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 60 MHz ใน $CDCl_3$

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^{13}C , ^{1}H NMR spectral ของ compound **(4)** ใน CDCl3 และ (+)-syringaresinol

Position	Compound **(4)** δ_C [a]	(+)-syringaresinol [9] δ_C [b]	Compound **(4)** δ_H, mult, J (H_Z) [a]	(+)-syringaresinol [10] 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] ^{13}C วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 100 MHz และ ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 400 MHz ใน $CDCl_3$

[b] ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 60 MHz ใน $CDCl_3$

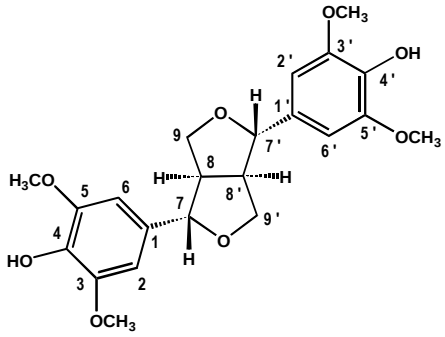
Compound **(4)** ถูกแยกออกและได้ผลึกโดยใช้ MeOH มีค่าจุดหลอมเหลว 173-174 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบ Compound **(4)** โดยใช้เทคนิคทาง spectroscopic พบว่ามีสูตรโมเลกุล คือ $C_{22}H_{26}O_8$ โดยใช้เครื่อง EIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเชิงไอออน m/z = 418

ข้อมูลจาก ^{13}C NMR ที่ 100 MHz และ DEPT spectra (Dept-90 and DEPT-135) จะปรากฏสัญญาณ 8 สัญญาณ รายละเอียดแสดง (ดังตารางที่ 1) คือ 1 สัญญาณของ methoxy carbons δ 56.6 (CH_3O), 1 สัญญาณของ 2 methylene carbons δ 72.4 (CH_2-9, 9′), 1 สัญญาณของ 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′)

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ที่ 400 MHz ของสารประกอบ compound **(4)** แสดง 3 singlets ที่ 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), 1 doublet ที่ δ 4.74 (d, 2H, J = 4.3 Hz, CH-7, 7′) และ 2 doublet of 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′) จากการแสดงดังกล่าวแสดงว่า โปรตอนเป็นแบบอสมมาตรที่ C-9 และ C-9′ จากความสัมพันธ์กันของโปรตอนเหล่านี้จะใช้ข้อมูลสเปกตรัม COSY และการเชื่อมต่อระหว่าง C-H พันธะถูกนำมา

แสดงใน HMQC NMR สเปกตรัม และข้อมูลสเปกตรัม HMBC ของสารประกอบ Compound **(4)** แสดงให้เห็นการเชื่อมต่อกันของ C-H สองหรือสามความสัมพันธ์ของพันธะที่เชื่อมต่อกัน

ข้อมูลสเปกตรัมของสารประกอบ Compound **(4)** และการเปรียบเทียบของ ^{1}H and ^{13}C NMR กับ (+)-syringaresinol รายละเอียดแสดง (ดังตารางที่ 2) โครงสร้างของสารประกอบ compound **(4)** ถูกระบุว่าคือ (+)-syringaresinol ซึ่งจากรายงานจุดหลอมเหลวของ (+)-syringaresinol มีค่า 173-174 องศาเซลเซียส



(4)

ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลขของCompound **(4)**

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ^{13}C, ^{1}H และ HMBC NMR spectral ของ Compound **(5)** ใน $CDCl_3$

Position	δ_C	δ_H, mult, J (H_Z)	HMBC
2	162.1 (C)		C-2 ↔ H-3, 4
3	113.3 (CH)	6.28, d, 9.45	C-3 ↔ H- 4
4	143.8 (CH)	7.65, d, 9.45	C-4 ↔ H-3, 5
4a	112.1 (C)		C-4a ↔ H- 3, 8
5	111.2 (CH)	6.95, s	C-5 ↔ H- 4
6	149.0 (C)		C-6 ↔ H-4, 5, 8, 6-OCH_3
7	150.8 (C)		C-7 ↔ H-5, 8, 6-OCH_3
8	99.4 (CH)	6.85, s	C-8 ↔ H-4, 5, 6-OCH_3
8a	143.0 (C)		C-8a ↔ H-5, 8
6-OCH_3	56.3 (CH_3)	3.95, s	

[a] ^{13}C วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 100 MHz และ ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 400 MHz ใน $CDCl_3$

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูล ^{13}C, ^{1}H และ NMR spectral ของ compound **(5)** ใน $CDCl_3$ และ scopoletin

Position	Compound **(5)** δ_C [a]	Scopoletin[11] δ_C [b]	Compound **(5)** δ_H [a], mult, J (H_Z)	Scopoletin[12] δ_H [c], mult, J (H_Z)
2	162.1 (C)	160.5		
3	113.3 (CH)	111.6	6.28, d, 9.45	6.15, d
4	143.8 (CH)	144.2	7.65, d, 9.45	7.76, d
4a	112.1 (C)	110.5		
5	111.2 (CH)	109.5	6.95, s	7.04, s
6	149.0 (C)	145.2		
7	150.8 (C)	151.1		
8	99.4 (CH)	102.7	6.85, s	6.79, s
8a	143.0 (C)	149.6		
6-OCH_3	56.3 (CH_3)		3.95, s	3.88, s

[a] ^{13}C วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 100 MHz และ ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 400 MHz ใน $CDCl_3$+CD_3OH

[b] ^{13}C วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 15 MHz ใน DMSO-d_6

[c] ^{1}H วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 100 MHz ใน $CDCl_3$+ DMSO-d_6

Compound **(5)** แยกได้ผลึกสีขาวรูปเข็มหรือรูปปริซึม มีค่าจุดหลอมเหลว 204-205 องศาเซลเซียส Compound **(5)** ถูกทำให้ชัดเจนโดยวิธี spectroscopic สูตรโมเลกุล $C_{10}H_8O_4$ โดยใช้เครื่อง EIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเชิงไอออน m / z = 192

ข้อมูลจาก ^{13}C NMR ที่ 100 MHz และ DEPT spectra (Dept-90 และ DEPT-135) ของสาร สารบริสุทธิ์ที่ 5 จะปรากฏสัญญาณ 10 สัญญาณ รายละเอียด แสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งแสดง a methoxy carbon δ 56.3 (CH_3O), four methine carbons δ 143.8 (CH-4), δ 113.3 (CH-3), δ 111.2 (CH-5) และ δ 99.4 (CH-8) และ quaternary carbons ทั้ง 5 ตำแหน่ง มีค่า δ ดังนี้คือ δ 162.1 (C-2), δ 150.8 (C-7), δ 149.0 (C-6), δ 143.0 (C-8a) และ δ 112.1 (C-4a)

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ที่ 400 MHz ของสาร Compound **(5)** แสดงสัญญาณแบบ doublets 2 ตำแหน่ง ที่ δ 7.65 (J = 9.45) และ δ 6.28 (J = 9.45) แสดงว่าพันธะคู่ระหว่าง C-3 และ C-4 นอกจากนี้ยังมีสัญญาณแบบ singlets อีก 3 ตำแหน่ง คือ กลุ่ม methoxy ที่ δ 3.95 และโปรตอนในวงเบนซินที่ δ 6.95

(CH-5) และ δ 6.85 (CH-8) รายละเอียดแสดง ดังตารางที่ 3

ความสัมพันธ์ของโปรตอนวิเคราะห์จากข้อมูลใน COSY spectral ส่วนสัญญาณการคู่ควบระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่อยู่ติดกัน วิเคราะห์จากข้อมูลที่แสดงใน HMQC - NMR spectral ข้อมูล HMBC spectral ของสาร Compound **(5)** แสดงความสัมพันธ์ของ C - H ที่อยู่ติดกันรวมทั้งพันธะคู่หรือพันธะสาม

ข้อมูล spectral ของสาร Compound **(5)** เปรียบเทียบกับ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ของ scopoletin รายละเอียดแสดง ดังตารางที่ 4 สูตรโครงสร้างของสาร Compound **(5)** เปรียบเทียบกับ scopoletin หรือ 7-hydroxy-6-methoxycoumarin จุดหลอมเหลวของ scopoletin จากรายงานมีค่า 204-205 องศาเซลเซียส และ 204 องศาเซลเซียส ตามลำดับ scopoletin สามารถพบได้อย่างกว้างขวางในพืชทั่วโลก เช่น *Gelsemium sempervirens*, *Atropa belladonna*, *Ipomoea orizabensis*, *Prunus serotina*, *Fabiana imbricata*, *Diospyros spp*., *Peucedanum spp*., *Skimmia spp*., และนอกจากนั้นยังพบใน Chinese crude drug toki (จาก *Angilica acutiloba*) อีกด้วย สารประกอบนี้สามารถแสดงผลในการทดลองทางชีวภาพในหลายด้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการยับยั้งอาการกล้ามเนื้อกระตุก

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดรากโลดทะนง (แดง) (*Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib) จำนวน 1.5 กิโลกรัม ที่สกัดด้วยวิธี ซีเควนเชียล (Sequential extraction) ด้วยสารละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ พบว่าสารสกัดรากโลดทะนง (แดง) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน จะพบสาร rediocide มากที่สุด และเมื่อนำสารมาสกัดต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตรวจสอบสารด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและเครื่องฉาย (UV) ผลจากการแยกพบว่าได้สาร 5 ชนิด จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ทำให้ทราบว่าสาร 5 ชนิด คือ rediocide A, rediocide B, rediocide C, Compound **(4)** คือ (+)-syringaresinol สารที่ได้เป็นผลึก มีค่าจุดหลอมเหลว 173 - 174 องศาเซลเซียส และ Compound **(5)** คือ scopoletin สารที่ได้เป็นผลึกรูปเข็ม มีค่าจุดหลอมเหลว 204 - 205 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และวรวรรณ พันธุมนาวิน. (2548). **นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

เย็นหทัย แน่นหนา. (2545). **สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์**. คณะวิทยาสาสตร์

และเทคโนโลยี มหาวทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

Chung BH, Kim S, Kim JD, Lee JJ, Baek YY, Jeoung D, Lee H, Choe J, Ha KS, Won MH, Kwon YG, Kim YM. (2012). Syringaresinol causes vasorelaxation by elevating nitric oxide production through the phosphorylation and dimerization of endothelial nitric oxide synthase. **Exp Mol Med**, 44(3): 191-201.

Jayasuriya, H., Zink, D. L., Borris, R. P., Nanakorn, W., Beck, H. T., Balick, M. J., et al. (2004). Rediocides B-E, potent insecticides from *Trigonostemon reidioides*. **J Nat Prod**, 67(2): 228-231.

Li, S. F., Di, Y. T., Li, S. L., Zhang, Y., Yang, F. M., Sun, Q. Y., et al. (2011). Trigonosins A-F, daphnane diterpenoids from *Trigonostemon thyrsoideum*. **J Nat Prod**, 74(3): 464-469.

Li, S. F., Zhang, Y., Li, Y., Li, X. R., Kong, L. M., Tan, C. J., et al. (2012). beta-Carboline alkaloids from the leaves of *Trigonostemon lii* Y.T. Chang. **Bioorg Med Chem Lett**, 22(6), 2296-2299.

Pan R, Gao XH, Li Y, Xia YF, Dai Y. (2010). Anti-arthritic effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decrease dangiogesis in synovium. **Fundam Clin Pharmacol**, 24(4), 477-90.

Pouchert CJ and Behnke J. (1993**).The Aldrich® Library of ^{13}C and ^{1}H FT-NMR Spectra**. Edition I (vol II). scopoletin (Aldrich 24, 658-1); Aldrich Chemical Company, Inc. 1314.