



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลของดีปลี

The study of chemical constituents from fruits of *Piper retrofractum* Vahl

ชื่อนิสิต นางสาวสุชานารถ บุญศรีสุข เลขประจำตัว 5833100723

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลของดีปลี

The study of chemical constituents from fruits of

Piper retrofractum Vahl

โดย

นางสาวสุชานารถ บุญศรีสุข

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

โครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลของดีปรี
โดย นางสาวสุชานารถ บุญศรีสุข

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... *วิวัฒน์ งามดี* ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ ชวศิริ)

..... *ปรีชา ภูวไพริศาล* อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพริศาล)

..... *บุญรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ* กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... *วุฒิชัย พาราสุข* หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ *๒๔* เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลของดีป्ली
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวสุชานารถ บุญศรีสุข เลขประจำตัว 5833100723
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพริศรศาล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารจากผลดีป्ली โดยนำผลดีป्लीมาสกัดในเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต นำสิ่งสกัดเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าแยกได้สารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 7 ชนิด คือ *N*-[(2*E*,4*E*)-tetradecadienoyl]-piperidine (**SB1**), (2*E*) 1-(piperidin-1-yl)-tetradec-2-en-1-one (**SB2**), 1-[(2*E*,4*E*)-1-oxo-2,4-hexadecadienyl]-piperidine (**SB3**), piperlongimin B (**SB4**), methyl piperate (**SB5**), guineensine (**SB6**) และ piperine (**SB7**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้

คำสำคัญ: ดีป्ली, เทคนิคโครมาโทกราฟี, วิธีทางสเปกโทรสโกปี

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยและรายงานฉบับนี้จะไม่สำเร็จล่วงไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูง ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิรศาล ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา ถ่ายทอดประสบการณ์ต่าง ๆ ตลอดจนปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ในรายงานฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษยรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติเป็นประธาน และกรรมการสอบงานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงให้คำแนะนำและข้อสงสัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พี่จิวตา ยอดสวัสดิ์ ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำแนวทาง เทคนิคการวิจัย เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดจนการปรับปรุงและตรวจสอบรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณกำลังใจจากเพื่อน ๆ ในภาคเคมีทุกคน และขอขอบคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนในทุก ๆ เรื่อง และให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอนุมัติ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญแผนภาพ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจของโครงการ	1
1.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของดีป्ली	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 การทดลองและผลการทดลอง	10
2.1 พืชตัวอย่าง	10
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	10
2.3 สารเคมี	11
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	11
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	12
2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	12
2.5.2 ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)	13
2.5.3 เซฟาเดกซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Sephadex LH-20 Column Chromatography)	14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.4 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)	14
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	15
2.6.1 การสกัดด้วยเฮกเซน	15
2.6.2 การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน	15
2.6.3 การสกัดด้วยเอทิลแอซีเทต	16
2.7 การแยกสารประกอบ	16
2.7.1 การแยกสารประกอบจากสิ่งสกัดเฮกเซน	16
2.7.2 การแยกสารประกอบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต	18
บทที่ 3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	23
3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB1	24
3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB2	27
3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB3	27
3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB4	29
3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB5	31
3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB6	33
3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB7	35
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	37
ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	42
ประวัติผู้วิจัย	45

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ลักษณะของต้น ใบ ผลอ่อน และผลแก่ของตีปาลี (<i>Piper retrofractum</i> Vahl)	3
รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากรากของตีปาลี (<i>Piper retrofractum</i> Vahl) โดย Rao และคณะ (2009)	4
รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากรากของตีปาลี (<i>Piper retrofractum</i> Vahl) โดย Rao และคณะ (2011)	5
รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากผลของตีปาลี (<i>Piper retrofractum</i> Vahl) โดย Jiang และคณะ (2013)	6
รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากใบของตีปาลี (<i>Piper retrofractum</i> Vahl) โดย Luyen และคณะ (2014)	7
รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากผลของตีปาลี (<i>Piper retrofractum</i> Vahl) โดย Muharini และคณะ(2015)	8
รูปที่ 3.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของสารที่แยกได้	23
รูปที่ 3.2 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB1	25
รูปที่ 3.3 ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) ของ SB1	25
รูปที่ 3.4 โครงสร้างสาร SB1	26
รูปที่ 3.5 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB2	27
รูปที่ 3.6 โครงสร้างสาร SB2	27
รูปที่ 3.7 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB3	28
รูปที่ 3.8 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB1 เทียบกับ SB3	29
รูปที่ 3.9 โครงสร้างสาร SB3	29
รูปที่ 3.10 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB4	30
รูปที่ 3.11 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB2 เทียบกับ SB4	31
รูปที่ 3.12 โครงสร้างสาร SB4	31
รูปที่ 3.13 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB5	32
รูปที่ 3.14 ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) ของ SB5	33

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.15 โครงสร้างสาร SB5	33
รูปที่ 3.16 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ SB6	34
รูปที่ 3.17 ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) ของ SB6	35
รูปที่ 3.18 โครงสร้างสาร SB6	35
รูปที่ 3.19 ^1H spectrum NMR (400 MHz, CDCl_3) ของ SB7	36
รูปที่ 3.20 โครงสร้างสาร SB7	36
รูปที่ 4.1 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	37

สารบัญแผนภาพ

	หน้า
แผนภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดผลดีปัสัด้วยเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทิลแอซีเทต	16
แผนภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของผลดีปัสัจากสิ่งสกัดเฮกเซน	21
แผนภาพที่ 2.3 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของผลดีปัสัจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต	22

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
รูปที่ 1 โครมาโทแกรมของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซนที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร	43
รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซนที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	44
รูปที่ 3 สเปกตรัม HMBC ของ SB5	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

UV	ultraviolet
TLC	thin layer chromatography
NMR	nuclear magnetic resonance
^1H NMR	proton nuclear magnetic resonance
^{13}C NMR	carbon nuclear magnetic resonance
CDCl_3	deuterated chloroform
δ_{H}	chemical shift of proton (NMR)
δ_{C}	chemical shift of carbon (NMR)
Hz	Hertz
MHz	megahertz
s	singlet (NMR)
d	doublet (NMR)
t	triplet (NMR)
dd	doublet of doublets (NMR)
dt	doublet of triplet (NMR)
m	multiplet (NMR)
brs	broad singlet (NMR)
J	coupling constant (Hz)
m/z	mass per charge number of ions (mass spectroscopy)
HRESIMS	high-resolution electrospray ionization mass spectrometry
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation

บทที่ 1

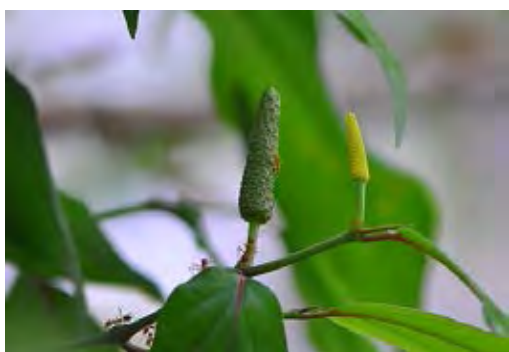
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจของโครงการ

ปัจจุบันพืชสมุนไพรได้ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากผู้บริโภคตระหนักถึงอันตรายและผลข้างเคียงจากการใช้สารเคมี การใช้สมุนไพรมีความปลอดภัยสูงและที่สำคัญสามารถลดค่าใช้จ่ายในการรักษาได้ ดังนั้นการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการใช้ประโยชน์และการพัฒนาความก้าวหน้าทางยารักษาโรคในปัจจุบัน เนื่องจากทำให้ค้นพบสารที่มีประโยชน์มากมายจากธรรมชาติ โดยเฉพาะในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ซึ่งสารเหล่านี้มีผลข้างเคียงน้อยมากเมื่อเทียบกับสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี สำหรับการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องอาศัยวิธีการทดสอบฤทธิ์และเทคนิคในการแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ทราบว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ อาจต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากพืช โดยพืชที่เลือกคือดีปลี เนื่องจากดีปลีมีสรรพคุณทางยามากมาย ในการแพทย์แผนโบราณ มักใช้แก้อาการจุกเสียดแน่นท้อง แก้อืดท้องเพื่อช่วยขับเสมหะ ลดอาการคันคอ ลดอาการไอ แก้อาการนอนไม่หลับ ช่วยให้เจริญอาหาร รักษาโรคทางเดินอาหารและลำไส้ ต้านเชื้อรา เป็นต้น^{1,2} นอกจากนี้ดีปลียังเป็นสมุนไพรและเครื่องเทศที่มีศักยภาพและโอกาสในการผลิตเพื่อการค้า มีการส่งเสริมให้ปลูกมากขึ้น เนื่องจากมีความต้องการจากตลาดภายในสำหรับเป็นส่วนประกอบยาแผนโบราณ เครื่องเทศ และผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชสำหรับอุตสาหกรรมยาแผนโบราณ ดีปลีใช้เข้าตำรับยาแทบทุกตำรับ ข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) พบว่าดีปลีมีจำนวนทะเบียนยาแผนโบราณถึง 1,134 ตำรับ³ และนอกจากนี้ ดีปลียังเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่อยู่ในแผนพัฒนาเพื่อเป็นสินค้าส่งออก แต่ปริมาณดีปลีที่ผลิตได้ในปัจจุบันยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการศึกษารายละเอียดของดีปลี จึงมีส่วนสำคัญในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ ให้ดีปลีของไทยเป็นที่ต้องการของตลาดโลก

1.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของตีปาลี

ตีปาลี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper retrofractum* Vahl เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในวงศ์ Piperaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับพริกไทย มีชื่อเรียกอื่น ๆ แตกต่างกันตามท้องถิ่นเช่น ปานนุ ประดงข้อ (ภาคกลาง) ตีปาลีเชือก (ภาคใต้) เป็นต้น มีถิ่นกำเนิดที่เกาะมัลดีคัส ประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และภาคใต้ของประเทศไทย แหล่งผลิตตีปาลีแหล่งใหญ่อยู่ที่ประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย⁴ ตีปาลีเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง ขึ้นเลื้อยพัน ลำต้นค่อนข้างกลมเรียบ เปราะ หักง่าย บริเวณข้อมีรากสำหรับยึดเกาะ แตกกิ่งก้านมาก ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับตามข้อใบ รูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 7-10 เซนติเมตร ผิวด้านหลังใบเป็นมัน หลังใบมีขนปกคลุมเล็กน้อย โคนเบี้ยว ปลายแหลม ขอบเรียบ มีเส้นใบออกจากโคน 3-5 เส้น ก้านใบยาว 1-1.5 เซนติเมตร ใบยอดกิ่งไม่มีก้าน ใบและเถามีรสเผ็ดร้อน (รูปที่ 1.1) ดอกเป็นช่อตั้งตรงข้ามกับใบ ออกเป็นช่อจากง่ามใบ หรือปลายยอด มีดอกย่อยเรียงกันอัดแน่นบนแกนช่อลักษณะเป็นแท่งกลมยาวทรงกระบอก ปลายเรียวมน ยาวประมาณ 1-2 นิ้ว สีเขียว เมื่อแก่มีสีเหลืองอมแดง มีขนปกคลุมเล็กน้อย ไม่มีก้านดอกย่อย ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก ก้านช่อดอกยาวเท่ากับก้านใบ ช่อดอกเพศผู้ยาว 4-5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร ก้านดอกยาว 2-3.5 เซนติเมตร มีเกสรเพศผู้ 2-3 อัน ช่อดอกเพศเมีย ยาว 3-4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ผลสดอัดกันแน่นบนแกนช่อ ยาว 2.5-5 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร โคนกว้าง ปลายมน ผิวผลเรียบ ผลย่อยขนาดเล็กจะติดกันเป็นแท่งหลอมรวมกัน แยกจากกันไม่ได้ ผลมีรสเผ็ดร้อน มีสีเขียว เมื่อสุกจะเป็นสีน้ำตาลแกมแดง ผลย่อยมีเมล็ดเดี่ยว เมล็ดมีขนาดเล็กมาก กลมและแข็ง⁵



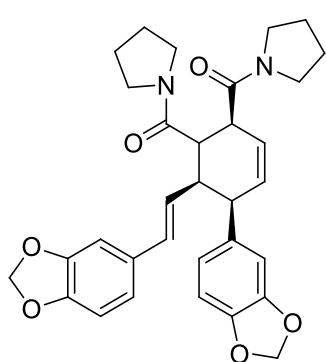
รูปที่ 1.1 ลักษณะของต้น ใบ ผลอ่อน และผลแก่ของดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl)

ดีปลีจัดเป็นสมุนไพรสำคัญที่มีการนำมาใช้กันอย่างยาวนาน ทั้งใช้เป็นยาและประกอบอาหาร ซึ่งในประเทศไทยนิยมนำดีปลีมาเป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงอาหารประเภทแกงเผ็ด แกงคั่วต่าง ๆ ดีปลีเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่ดินร่วนซุย ชุ่มชื้นและอุดมสมบูรณ์ แต่ก็สามารถทนอากาศแห้งแล้งได้ดี สามารถปลูกได้ทั่วไปเพียงแค่ทำเสาหลักให้ยึดเกาะและหมั่นดูแลในเรื่องของโรคหรือแมลงเล็กน้อย

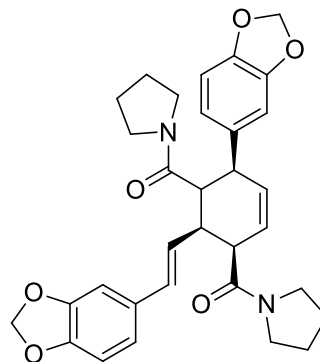
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับตีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) ที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มักจะพบองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นสารกลุ่ม amide และ dimeric alkaloids โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

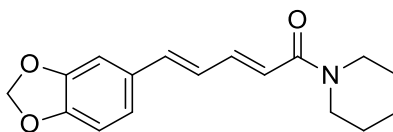
Rao และคณะ (2009) แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนรากตีปลีด้วยเมทานอล พบสารกลุ่มใหม่ในกลุ่ม dimeric alkaloids คือ chabamide F และ chabamide G และสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 3 ชนิด คือ piperine, guineensine และ brachystamide B⁶ (รูปที่ 1.2)



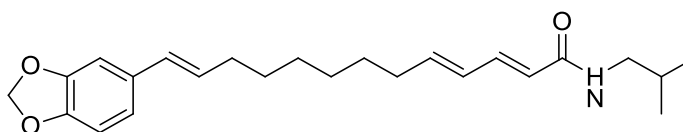
chabamide F



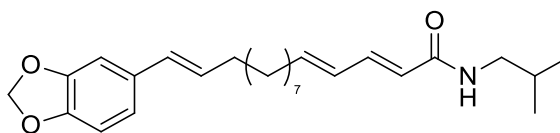
chabamide G



piperine



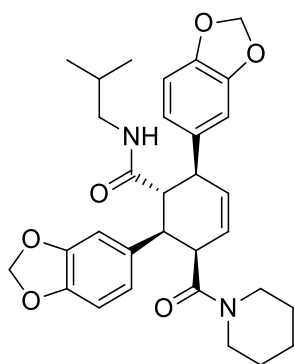
guineensine



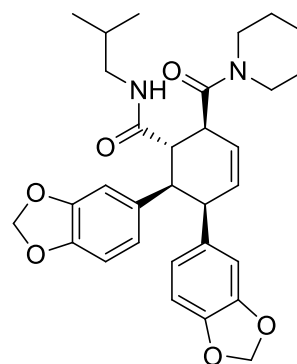
brachystamide B

รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากรากของตีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) โดย Rao และคณะ (2009)

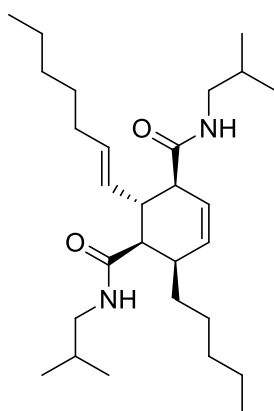
Rao และคณะ (2011) แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนรากตีปส์ด้วยเมทานอล พบสารกลุ่มใหม่ในกลุ่ม dimeric alkaloids คือ chabamide H, chabamide I, chabamide J และ chabamide K (รูปที่ 1.3) และสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 11 ชนิด คือ chabamide, chabamide F, chabamide G, piperine, trichostachine, pellitorine, piplartine, 4,5-dihydropiperlongumine, guineensine, brachystamide B และ sesamin หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HELA), เต้านม (MCF-7), ตับ (HEPG2), ลำไส้ใหญ่ (HT-29) และลำไส้ (COLO-205) พบว่า chabamide และ chabamide G มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (COLO-205) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.10 $\mu\text{g/mL}$ และ 0.018 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ⁷



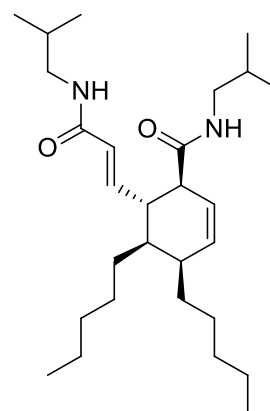
chabamide H



chabamide I



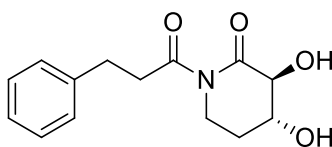
chabamide J



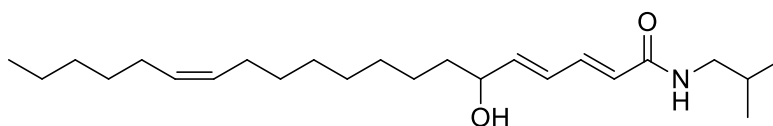
chabamide K

รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากรากของตีปส์ (*Piper retrofractum* Vahl) โดย Rao และคณะ (2011)

Jiang และคณะ (2013) แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนผลดีปัสตีด้วยเอทานอล พบสารใหม่ในกลุ่ม amide alkaloids 2 ชนิด คือ $3\beta, 4\alpha$ -dihydroxy-1-(3-phenylpropanoyl)-piperidine-2-one และ (2*E*, 4*E*, 14*Z*)-6-hydroxyl-*N*-isobutyleicosa-2,4,14-trienamide (รูปที่ 1.4) จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี พบว่า $3\beta, 4\alpha$ -dihydroxy-1-(3-phenylpropanoyl)-piperidine-2-one มีประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสตับอักเสบบี มีค่า IC_{50} ต่อ HBsAg เท่ากับ 1.80 mM และ HBeAg เท่ากับ 0.21 mM⁸



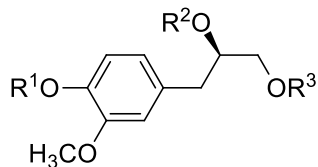
$3\beta, 4\alpha$ -dihydroxy-1-(3-phenylpropanoyl)-piperidine-2-one



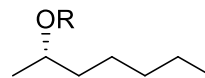
(2*E*, 4*E*, 14*Z*)-6-hydroxyl-*N*-isobutyleicosa-2,4,14-trienamide

รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากผลของดีปัสตี (*Piper retrofractum* Vahl) โดย Jiang และคณะ (2013)

Luyen และคณะ (2014) แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนใบดีปัสตีด้วยเมทานอล พบสารใหม่ในกลุ่ม phenylpropanoid และ alkylglycoside คือ piperoside และ isoheptanol 2(S)-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranoside (รูปที่ 1.5) และสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 10 ชนิด คือ 3,4-dihydroxyallylbenzene, 1,2-di-O- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene, tachioside, benzyl-O- β -D-glucopyranoside, icaraside F₂, dihydrovomifoliol-3'-O- β -D-glucopyranoside, isopropyl O- β -D-glucopyranoside, isopropyl primeveroside, *n*-butyl O- β -D-glucopyranoside, isoheptanol 2(S)-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranoside จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง α -glucosidase พบว่า สารประกอบที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase ปานกลาง โดยเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเอนไซม์ของ benzyl-O- β -D-glucopyranoside และ icaraside F₂ คือ $4.60 \pm 1.74\%$ และ $11.97 \pm 3.30\%$ ตามลำดับ⁹

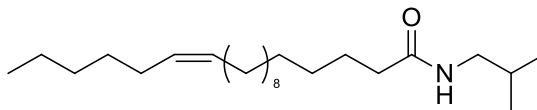


Piperoside

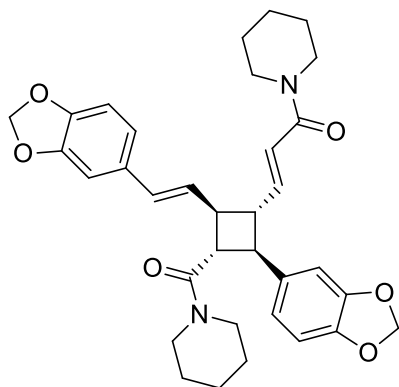
isoheptanol 2(S)-O- β -D-xylopyranosyl
(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranoside

รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากใบของตีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) โดย Luyen และ คณะ (2014)

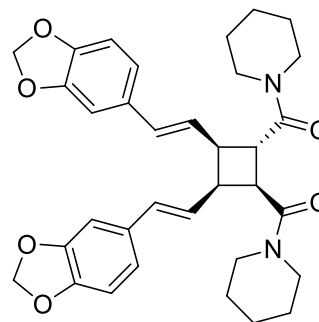
Muharini และคณะ (2015) แยกสารจากสิ่งสกัดในส่วนผลตีปลี พบสารกลุ่มใหม่ในกลุ่ม amide 3 ชนิด คือ (2E,14Z)-N-isobutyleicosa-2,14-dienamide, dipiperamides F และ dipiperamides G (รูปที่ 1.6) และสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 30 ชนิด คือ (E)-4-(isobutylamino)-4-oxo-2-butenoic acid, 3,4-methylenedioxy cinnamaldehyde, piperonyl anhydride, piperine, isochavicine, piperanine, piperlonguminine, scutifoliamide A, dihydropiperlonguminine, pellitorine, pipericine, (2E,4E)-N-isobutyleicosa-2,4-dienamide, (2E,4E,12Z)-N-isobutyloctadec-2,4,12-trienamide, (2E,4E,14Z)-N-isobutyleicosa-2,4,14-eicosatrienamide, Pipereicosalidine, retrofractamide A, retrofractamide C, retrofractamide B, guineensine, brachystamide B, dehydropiperonaline, piperonaline, piperolein B, piperundecaline, piperchabamide C, nigramide F, chabamide, nigramide R, dipiperamide E และ piperchabamide H หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อและความเป็นพิษ พบว่า Piperanine แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ขณะที่ dipiperamides F, dipiperamides G, chabamide, nigramide R, dehydropiperonaline, piperonaline, guineensine, brachystamide B, retrofractamide C, pellitorine และ pipericine มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (L5178Y) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 10.0, 13.9, 11.6, 9.3, 8.9, 17.0, 17.0, 16.4, 13.4, 28.3, และ 24.2 μ M ตามลำดับ¹⁰



(2E,14Z)-N-Isobutyleicosa-2,14-dienamide



Dipiperamide F



Dipiperamide G

รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากผลของดีป्ली (*Piper retrofractum* Vahl) โดย Muharini และคณะ (2015)

จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า ดีป्लीมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและมักมีการรายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ อีกทั้งที่ผ่านมาพบว่าในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลของดีป्ली ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลของดีป्ली โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีด้วยข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโทรเมตรี โดยผู้วิจัยคาดว่าจะพบสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยาและการแพทย์ต่อไป

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจากผลดีป्ली
2. แยกสารองค์ประกอบอินทรีย์ที่ได้จากการสกัดผลดีป्लीให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี
3. พิสูจน์ทราบเอกลักษณ์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากผลดีป्लीโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของผลดีป्ली
2. ได้สารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

ผลดีปัสที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ซื้อมาจากร้านเจ้ากรมเปือ ถนนจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 จำนวน 4 กิโลกรัม

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ (column)
2. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
3. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
4. บีกเกอร์ (beaker)
5. หลอดทดลอง (test tube)
6. หลอดหยดสาร (dropper)
7. แท่งแก้วคนสาร (glass rod)
8. กระบอกตวง (cylinder)
9. กรวยแก้ว (glass funnel)
10. หลอดคะปิลลารี (capillary tube)
11. กระดาษกรอง (filter paper)
12. ขาตั้งและแคลมป์ (stand & clamp)
13. ไมโครปิเปต (micropipette)
14. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography)
15. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (analytical balance 4 digit)
16. เครื่องให้ความร้อน (hotplate)
17. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
18. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer: NMR)
19. เครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer)

20. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography: HPLC)
21. เครื่องแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (flash column chromatography) รุ่น Isolera
22. UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้คือ 254 นาโนเมตร

2.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate) เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) แอซิโตน (acetone) คลอโรฟอร์มดี (CDCl_3) และน้ำ milli Q
2. ซิลิกาเจล เบอร์ 7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography)
3. เซฟาเด็กซ์ (sephadex LH-20)
4. ตัวทำปฏิกิริยา anisaldehyde

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จัดหาผลดีปัสและสารเคมี
2. นำผลดีปัสมาทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ
3. นำสารสกัดที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography), เซฟาเด็กซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟี (sephadex LH-20 column chromatography), ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography: HPLC) และแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (flash column chromatography) เป็นต้น พร้อมศึกษาหาวิถีกาเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยแผ่น TLC หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ให้ทำการแยกซ้ำโดยการเปลี่ยนวิถีกาเคลื่อนที่
4. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) และแมสสเปกโทรเมตรี (MS) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว
5. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets silica gel 60 F254 ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการกำหนดระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต่มีสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคอปิลลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บรรจุด้วยกระดาษกรองและมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุดที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยส่องด้วยแสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในตัวทำปฏิกิริยา anisaldehyde แล้ววางบนเครื่องให้ความร้อน (hotplate) อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

ก. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาดและมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การแต้มสาร นำแผ่น TLC มาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปด้านบน และขีดกำหนดระดับด้านล่างตรงตำแหน่งที่ต้องการแต้มสาร จากนั้นใช้หลอดคอปิลลารีจุ่มลงไปใส่สารละลายที่ต้องการทดสอบ แล้วแต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นที่ใช้ดินสอขีดไว้ ให้เป็นจุดวงกลมเล็ก ๆ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตรและแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร หลังจากจุดสารที่แต้มแห้งสนิทแล้ว จึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้ว ทั้งนี้ระดับของจุดสารบน TLC ควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อย จากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ใช้ดินสอขีดไว้ แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร นำแผ่น TLC ไปส่องกับแสง UV เพื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสง UV ของสาร ในกรณีที่สารไม่สามารถดูดกลืนแสง UV ให้นำแผ่น TLC ไปจุ่มในตัวทำปฏิกิริยา anisaldehyde แล้ววางให้ความร้อนบนเครื่องให้ความร้อน (hotplate) ตำแหน่งที่มีสารจะปรากฏให้เห็น

2.5.2 ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Gel Column Chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกสารโดยใช้ความแตกต่างจากขั้วของสาร โดยวัฏภาคหนึ่งหรือตัวดูดซับ (stationary phase) จะมีแรงดึงดูดกับสารชนิดต่าง ๆ ด้วยความแรงต่างกัน ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูงจึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วสูงได้แข็งแรงกว่าสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นวัฏภาคเคลื่อนที่หรือตัวทำละลาย (mobile phase) จึงชะสารต่างชนิดออกมาไม่พร้อมกัน สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารที่มีขั้วสูง) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี (สารที่มีขั้วต่ำ)

ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ต้องเหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยตัวดูดซับที่ใช้ควรมีปริมาณ 25-30 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง ก่อนบรรจุสารตัวอย่างในคอลัมน์ต้องอุบปลายคอลัมน์ด้วยสำลี จากนั้นจึงใส่ตัวดูดซับลงในคอลัมน์ โดยตัวดูดซับที่ใช้ในวิธีนี้คือซิลิกาเจล บรรจุคอลัมน์ด้วยวิธีแบบเปียกหรือวิธี slurry กล่าวคือ บรรจุตัวทำละลายลงในคอลัมน์ประมาณหนึ่งในสามส่วนของคอลัมน์ ใส่ตัวทำละลายในซิลิกาเจลแล้วคน (ส่วนผสมนี้เรียกว่า slurry) เท slurry ผ่านกรวยแก้วลงในคอลัมน์พร้อม ๆ กับเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ และใช้สายยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์ การไหลของตัวทำละลายและการเคาะจะช่วยให้ซิลิกาเจลอัดแน่น ทั้งยังป้องกันการเกิดฟองอากาศ แต่ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นให้ใช้ที่ขูดขูดอะซิโตนหุ้มรอบ ๆ บริเวณที่มีฟองอากาศ แล้วทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง การระเหยของตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำจะทำให้ตัวดูดซับเย็นลง เกิดการหดตัวและไล่ฟองอากาศออกไป แต่ถ้าฟองอากาศอยู่ไม่ลึกจากด้านบนอาจใช้แท่งแก้วคนตัวดูดซับแรง ๆ พร้อมกับเคาะด้านข้างของคอลัมน์ให้ตัวดูดซับลงมาอัดแน่นอีกครั้งหนึ่ง ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการและระดับของซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก ใช้แท่งแก้วเกลี่ยผิวของซิลิกาเจลให้เรียบ จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกาเจลแล้วปิดวาล์วคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารตัวอย่างที่จะนำเข้าสู่คอลัมน์ควรอยู่ในรูปสารละลายเข้มข้นและมีปริมาตรน้อย โดยใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างทั้งหมดใส่ที่ด้านบนของคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ไหลลงไปจนปริมาตรตัวดูดซับอีกครั้งหนึ่ง ใช้ปิเปตดูดตัวทำละลายที่ใช้ชะสาร ไล่ลงไปทีละน้อยเพื่อผลักดันให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปในซิลิกาเจล

เมื่อตัวชะไหลลงจนปริมาณซิลิกาเจลแล้ว จึงใส่ตัวชะเพิ่มทีละน้อย สังเกตสีของตัวชะที่อยู่เหนือซิลิกาเจลจะค่อย ๆ จางลง ทำเช่นนี้จนกระทั่งตัวทำละลายใสไม่มีสี แสดงว่าสารทั้งหมดได้ถูกนำเข้าสู่ซิลิกาเจลแล้ว จากนั้นจึงใส่ตัวชะปริมาณมากลงไป หรือการบรรจุสารตัวอย่างอีกวิธีคือระเหยตัวทำละลายออกจากสารตัวอย่างให้เกือบแห้งแล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจล โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไปบดเพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้ง จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ เติมซิลิกาเจลเล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย ตลอดจนการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะถ้าตัวดูดซับแห้งมันจะหดตัวจากผนังคอลัมน์ เกิดช่องว่างให้อากาศเข้าไปแทรกได้ และทำให้เกิดรอยแตกแยกในชั้นของซิลิกา จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.3 เซฟาเด็กซ์ คอลัมน์ โครมาโทกราฟี (Sephadex LH-20 Column Chromatography)

เป็นเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเหลว ซึ่งเป็นการแยกสารให้บริสุทธิ์ตามขนาดของโมเลกุล วัฏภาคหนึ่งประกอบด้วยอนุภาคเจลที่มีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ ยอมให้สารโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารูพรุนผ่านเข้าออกเนื้อเจลได้ สารโมเลกุลใหญ่กว่ารูพรุนจะเข้าเจลไม่ได้ จึงถูกชะออกมาตามช่องว่างระหว่างอนุภาคเจลโดยวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะออกจากคอลัมน์ได้ก่อนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่ต้องเสียเวลาผ่านเข้าไปในอนุภาคเจล โดยสารที่ใช้เป็นวัฏภาคหนึ่ง คือ เซฟาเด็กซ์ (sephadex LH-20) การบรรจุคอลัมน์ทำเช่นเดียวกับเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography)

2.5.4 ไฮเพอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนวัฏภาคหนึ่ง (stationary Phase) ภายใต้การพาของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับเครื่อง HPLC วัฏภาคหนึ่ง คือ สารที่อยู่ภายในคอลัมน์

ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง HPLC สารดังกล่าวจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เพื่อให้เกิดการแยกสาร (separation) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ (stationary phase) และความสามารถในการละลายของสารผสม โดยสารผสมตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่ จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ดีกับวัฏภาคหนึ่งจะถูกแยกออกมาทีหลัง นอกจากนี้การแยกสารผสมมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างของสาร และสมบัติทางเคมีของสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ สารแต่ละชนิดจะผ่านเข้าสู่อุปกรณ์วัดสัญญาณ (detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากเครื่องตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค เรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time, RT) เฉพาะตัว สารที่จะนำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC จะต้องพิจารณาถึงความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่ใช้ก่อน เพื่อป้องกันการไม่ละลายเข้าด้วยกันหรือการตกตะกอนของตัวทำละลายผสมและไม่ให้เกิดการอุดตันในระบบ ดังนั้นการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HPLC จึงจำเป็นต้องกรองด้วย membrane Filter ขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอนก่อนทุกครั้ง

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยเฮกเซน

นำผลดีป्लीที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 4 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน เป็นเวลา 2 วัน จำนวน 2 ครั้ง ได้สิ่งสกัดเฮกเซน (hexane crude extract) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีน้ำหนัก 144 กรัม

2.6.2 การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน

นำกากของผลดีป्लीที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน เป็นเวลา 2 วัน จำนวน 2 ครั้ง ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน (dichloromethane crude extract) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีน้ำหนัก 200 กรัม

2.6.3 การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

นำกากของผลดีป्लीที่เหลือจากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตท เป็นเวลา 2 วัน จำนวน 2 ครั้ง ได้สิ่งสกัดเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate crude extract) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีน้ำหนัก 44.5 กรัม รายละเอียดการสกัดได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 2.1



แผนภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดผลดีป्लीด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท

2.7 การแยกสารประกอบ

2.7.1 การแยกสารประกอบจากสิ่งสกัดเฮกเซน

1. นำสิ่งสกัดผลดีป्लीที่สกัดด้วยเฮกเซนมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัดน้ำหนัก 144 กรัม

2. นำสิ่งสกัดที่ได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (silica gel column chromatography) แล้วชะด้วยตัวทำละลาย 100% เฮกเซน และค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายด้วยเอทิลอะซิเตท จนถึง 100% เอทิลอะซิเตท นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นรวมแฟรกชันที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน โดยจะได้สารละลายจากคอลัมน์ทั้งหมด 8 แฟรกชัน (A-H) ดังสรุปไว้ในแผนภาพที่ 2.2

3. นำแฟรกชัน D มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน และค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนของไดคลอโรมีเทน ทีละน้อยไปจนกระทั่งถึง 100% ไดคลอโรมีเทน จากนั้นเปลี่ยนตัวชะเป็นตัวทำละลายผสมเอทิลแอซีเทต-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เอทิลแอซีเทต โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 6 แฟรกชัน ($D_{1.1}$ - $D_{1.6}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน $D_{1.5}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

4. นำแฟรกชัน $D_{1.5}$ มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายผสม 80% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน และค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนของไดคลอโรมีเทนทีละน้อยไปจนกระทั่งถึง 100% ไดคลอโรมีเทน เก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 4 แฟรกชัน ($D_{2.1}$ - $D_{2.4}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน $D_{2.3}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

5. นำแฟรกชัน $D_{2.3}$ มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เซฟาเด็กซ์เป็นตัวดูดซับ (sephadex LH-20 column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลาย 1:1 เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 3 แฟรกชัน ($D_{3.1}$ - $D_{3.3}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน $D_{3.2}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำแฟรกชัน $D_{3.2}$ มาแยกต่อด้วย flash column chromatography แบบ reversed phase ชะด้วยตัวทำละลายผสม 65% เมทานอล-น้ำ และค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนของเมทานอลทีละน้อยไปจนถึง 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 25 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 6 แฟรกชัน ($D_{4.1}$ - $D_{4.6}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน $D_{4.5}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

7. นำแฟรกชัน $D_{4.5}$ มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เซฟาเด็กซ์เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 1:1 เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 4 แฟรกชัน ($D_{5.1}$ - $D_{5.4}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมา

ตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่า แพรกชั้น D_{5.2} น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

8. นำ แพรกชั้น D_{5.2} มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 100% เฮกเซน และค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยตัวทำละลายอะซิโตน จนถึง 20% แอซิโตน-เฮกเซน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 4 แพรกชั้น (D_{6.1}-D_{6.4}) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแพรกชั้นมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสม 20% แอซิโตน-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่า แพรกชั้น D_{6.2} น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

9. นำ แพรกชั้น D_{6.2} มาแยกต่อด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ชะด้วยตัวทำละลายระบบ 85-95% เมทานอล-น้ำ ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเก็บสารละลายได้ทั้งหมด 9 แพรกชั้น (D_{7.1}-D_{7.9}) จากพีคที่ปรากฏที่ retention time (RT) ต่าง ๆ กัน ดังนี้ 21.066, 28.236, 31.003, 33.484, 36.131, 45.144, 48.408, 54.168 และ 59.012 นาที (ภาคผนวก) จากนั้นทำ TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสม 20% เอทิลแอซิเทต-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 8 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี โดย **SB1, SB2, SB3** และ **SB4** เป็นสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว และมีสารที่อยู่ในระหว่างการวิเคราะห์โครงสร้างอีก 4 ชนิด

2.7.2 การแยกสารประกอบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซิเทต

1. นำสิ่งสกัดผลดีป्लीที่สกัดด้วยเอทิลแอซิเทตมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัดน้ำหนัก 44.5 กรัม

2. นำสิ่งสกัดได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (silica gel column chromatography) แล้วชะด้วยตัวทำละลาย 100% เฮกเซน และค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยเอทิลแอซิเทต จนถึง 100% เอทิลแอซิเทต จากนั้นเปลี่ยนตัวชะเป็นตัวทำละลายผสม 50% เมทานอล-เอทิลแอซิเทต จนถึง 100% เมทานอล นำสารละลายแต่ละแพรกชั้นมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นรวมแพรกชั้นที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน โดยจะได้สารละลายจากคอลัมน์ทั้งหมด 9 แพรกชั้น (I-Q) ดังสรุปไว้ในแผนภาพที่ 2.3

4. แพรกชั้น J มีผลึกสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้น จึงนำมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **SB5**

5. แพรกชั้น N มีของแข็งสีขาวเกิดขึ้น จึงนำมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **SB6**

6. แพรกชั้น O มีผลึกใสสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้น จึงนำมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **SB7**

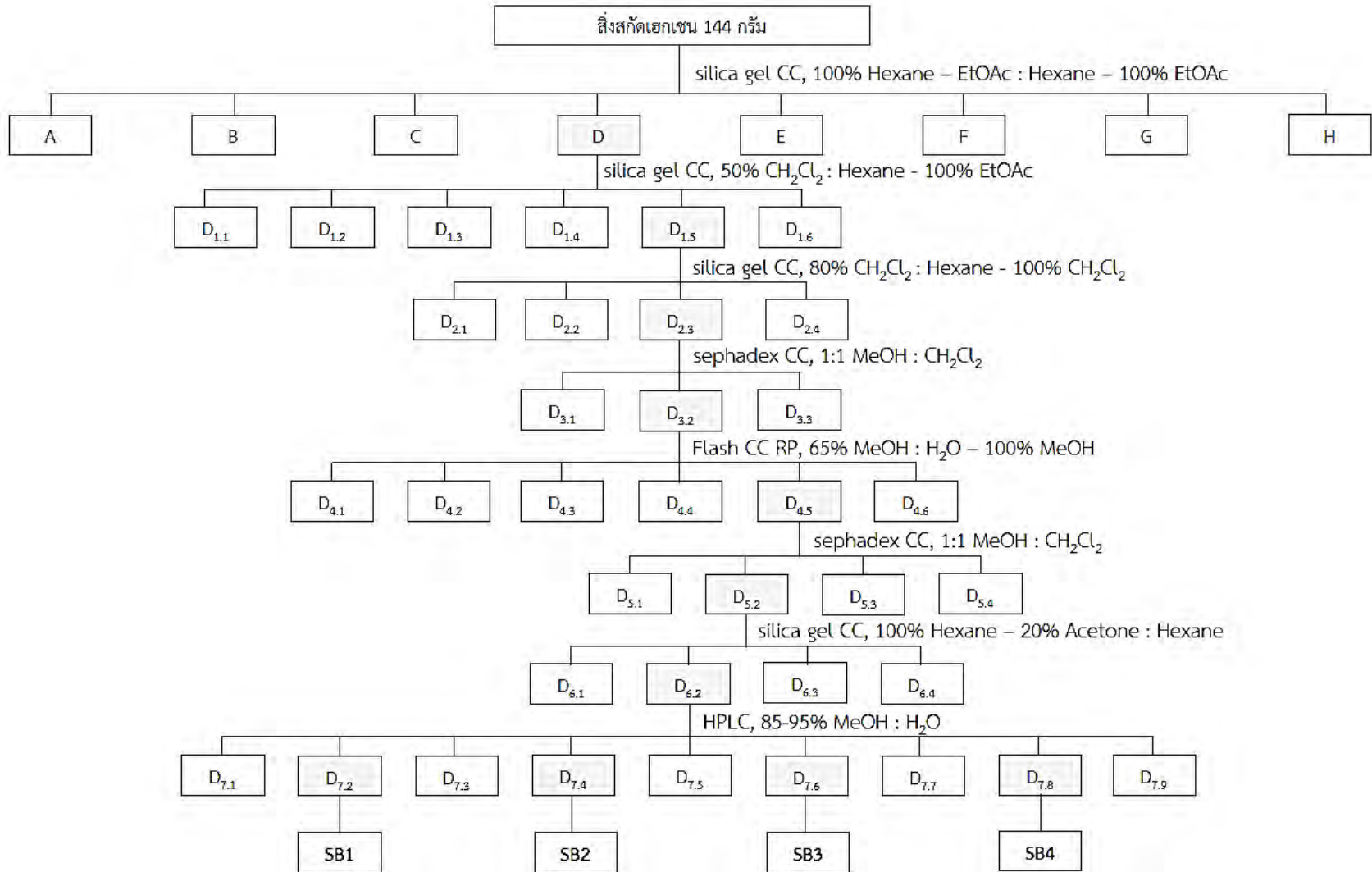
7. นำแพรกชั้น P มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้สารหนัก 5.6290 กรัม นำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เซฟาเด็กซ์เป็นตัวดูดซับ (sephadex LH-20 column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลาย 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 6 แพรกชั้น ($P_{1.1}$ - $P_{1.6}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแพรกชั้นมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสม 2% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแพรกชั้น $P_{1.4}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

10. นำแพรกชั้น $P_{1.4}$ มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เซฟาเด็กซ์เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 50% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 3 แพรกชั้น ($P_{2.1}$ - $P_{2.3}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแพรกชั้นมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสม 2% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแพรกชั้น $P_{2.2}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

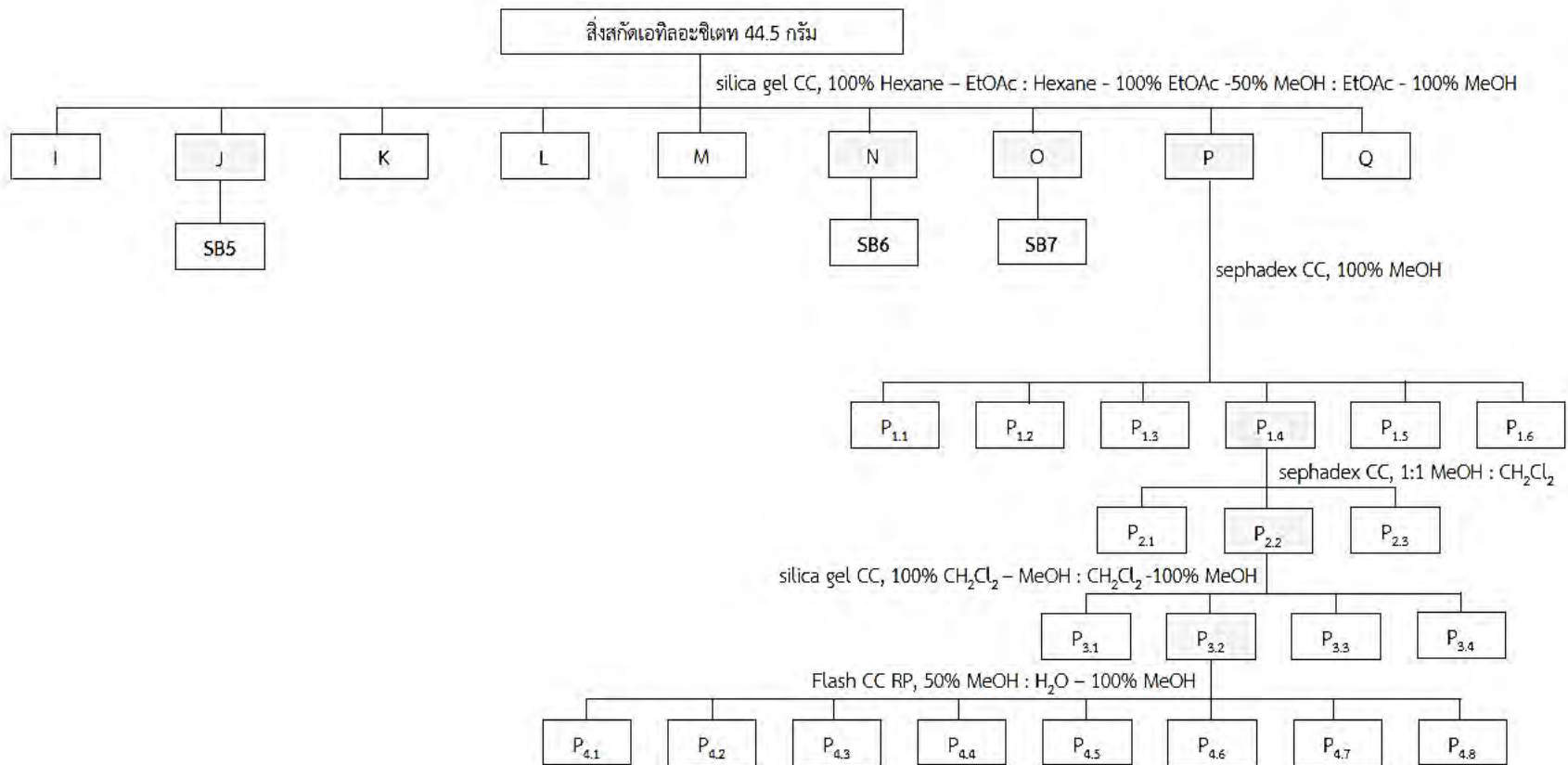
11. นำแพรกชั้น $P_{2.2}$ มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน และค่อย ๆ เพิ่มขั้วด้วยเมทานอล จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 4 แพรกชั้น ($P_{3.1}$ - $P_{3.4}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแพรกชั้นมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสม 15% เอทิลแอซิเทต-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแพรกชั้น $P_{3.2}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

13. นำแพรกชั้น $P_{3.2}$ ไปแยกต่อด้วย flash column chromatography ชะด้วยตัวทำละลาย 50% เมทานอล-น้ำ จนถึง 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 25 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 8 แพรกชั้น ($P_{4.1}$ - $P_{4.8}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำ

ละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสม 30% เอทิลแอซิทेट-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชันดังกล่าวที่แยกมาถึงขั้นตอนนี้ยังไม่บริสุทธิ์ และสามารถนำไปแยกต่อได้ แต่เนื่องจากเวลาจำกัดจึงทำให้ไม่สามารถทำการแยกต่อได้



แผนภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของผลดีป्लीจากสิ่งสกัดเฮกเซน



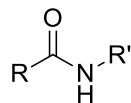
แผนภาพที่ 2.3 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของผลดีป्लीจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตท

บทที่ 3

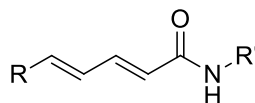
การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการทดลองพบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานโครงสร้างมาแล้ว 7 ชนิด จากสิ่งสกัดเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต สำหรับการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จะอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอน (^1H NMR) และคาร์บอน (^{13}C NMR) กับสารที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้

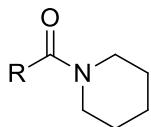
สารที่แยกได้ส่วนใหญ่จะรายงานเป็นสารกลุ่ม alkylamide (รูปที่ 3.1) โดยทางซ้ายมือมักพบ conjugated diene ต่อกับ amide หรือ alpha, beta unsaturated amide ส่วนทางขวามือมักเป็นวง piperidine หรือ alkyl group เช่น isobutyl



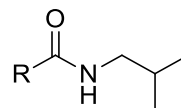
alkylamide



conjugated diene



piperidine



isobutyl

รูปที่ 3.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของสารที่แยกได้

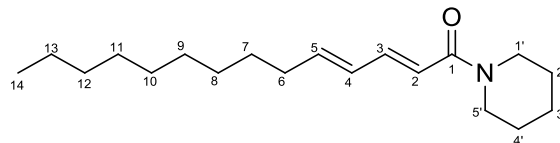
3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB1

สาร **SB1** ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืดไม่มีสี จากข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.2 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่ δ_{H} 7.23 (1H, dd, $J = 10.7, 15.0$ Hz, H-3), 6.23 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2), 6.15 (1H, dd, $J = 10.7, 15.0$ Hz, H-4) และ 6.04 (1H, m, H-5) สัญญาณโปรตอนของ methylene 16 สัญญาณที่ δ_{H} 2.13 (2H, m, H-6), 1.47 (2H, m, H-7) และ 1.26-1.35 (12H, m, H-8-H-13) สัญญาณโปรตอนของ piperidine ที่ δ_{H} 3.49, 3.61 (4H, brs, H-1', H-5'), 1.65 (2H, m, H-3') และ 1.57 (4H, m, H-2', H-4') และ สัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl ที่ปลายโซ่ที่ δ_{H} 0.88 (3H, t, $J = 6.2$ Hz, H-14)

จาก ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) พบข้อมูล chemical shift (รูปที่ 3.3) ดังนี้ δ_{C} 166.2 (C-1), 143.0 (C-3), 142.7 (C-5), 129.0 (C-4), 118.7 (C-2), 45.3 (C-1', C-5'), 33.1 (C-6), 32.0 (C-12), 29.0-29.7 (C-7-C-11), 25.4 (C-2', C-4'), 24.8 (C-3'), 22.8 (C-13), 14.2 (C-14)

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสาร **SB1** กับสาร *N*-[(2*E*,4*E*)-tetradecadienoyl]-piperidine พบว่ามีความใกล้เคียงกัน และจากข้อมูล HRESIMS พบไอออนพีดที่ (m/z) 292.2631 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (จากการคำนวณ $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}$ ได้ 291.2562) ทำให้สรุปได้ว่าสาร **SB1** คือ *N*-[(2*E*,4*E*)-tetradecadienoyl]-piperidine¹¹ ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.4

สารดังกล่าวเคยมีรายงานว่า แยกได้จากต้น *Otanthus maritimus* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศกรีซและเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae จากรายงานของ Christodoulopoulou และคณะ (2005) พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ฆ่ามด (*Crematogaster scutellaris*) และปลวก (*Reticulitermes balkanensis*)¹² สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ เป็นครั้งแรกที่มีการแยกสารดังกล่าวได้จากดีปลี



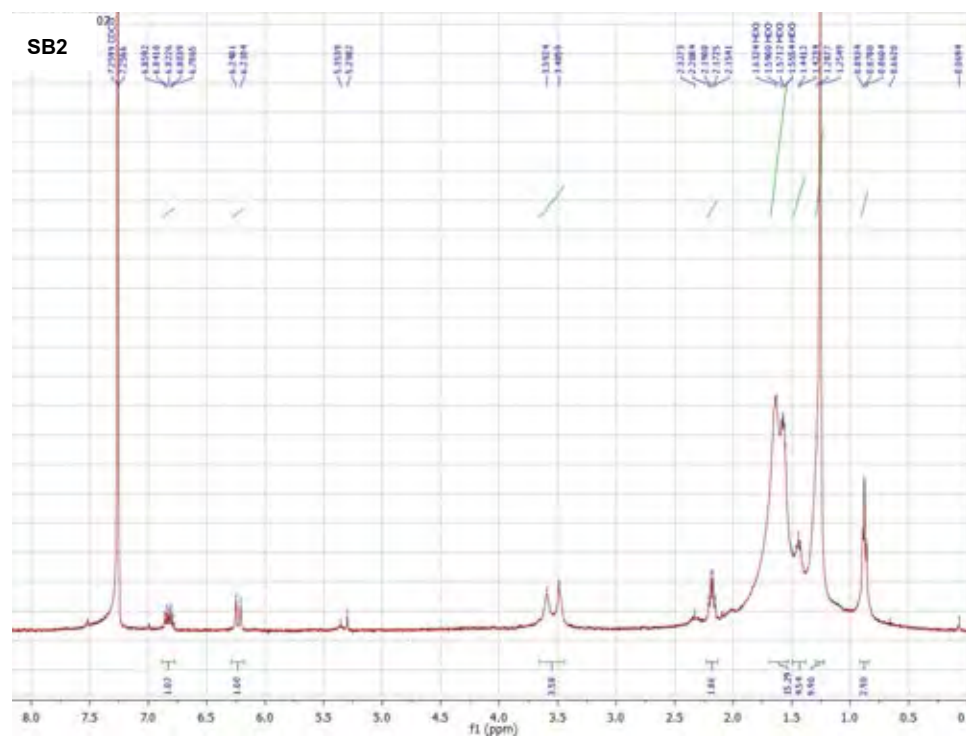
รูปที่ 3.4 โครงสร้างสาร SB1

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB2

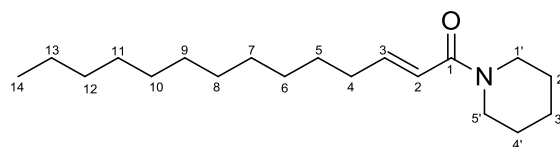
สาร **SB2** ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืดไม่มีสี จากข้อมูลสเปกตรัม $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.5 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic ที่ δ_{H} 6.82 (1H, dt, $J = 4.5, 15.0$ Hz, H-3) และ 6.23 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2) สัญญาณโปรตอนของ methylene 20 สัญญาณที่ δ_{H} 2.18 (2H, m, H-4), 1.47 (2H, m, H-5) และ 1.26-1.35 (16H, m, H-6-H-13) สัญญาณโปรตอนของ piperidine ที่ δ_{H} 3.48, 3.59 (4H, brs, H-1', H-5'), 1.65 (2H, m, H-3'), และ 1.57 (4H, m, H-2', H-4') และสัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl ที่ปลายโซ่ที่ δ_{H} 0.88 (3H, t, $J = 6.2$ Hz, H-14)

จากการเปรียบเทียบข้อมูล $^1\text{H NMR}$ ของ **SB2** กับ (2*E*)-1-(piperidin-1-yl)-tetradec-2-en-1-one พบว่ามีสัญญาณใกล้เคียงกัน และจากข้อมูล HRESIMS พบไอออนพีคที่ (m/z) 294.2495 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (จากการคำนวณ $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}$ ได้ 293.2719) ทำให้สรุปได้ว่าสาร **SB2** คือ (2*E*)-1-(piperidin-1-yl)-tetradec-2-en-1-one ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.6

สารดังกล่าวเคยมีรายงานว่า แยกได้จากต้นตีปาลี (*Piper retrofractum* Vahl) และพริกไทยขาว (muntok pepper) จากรายงานของ Wiemann และคณะ (2017) พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholinesterase ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์¹⁴



รูปที่ 3.5 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ **SB2**



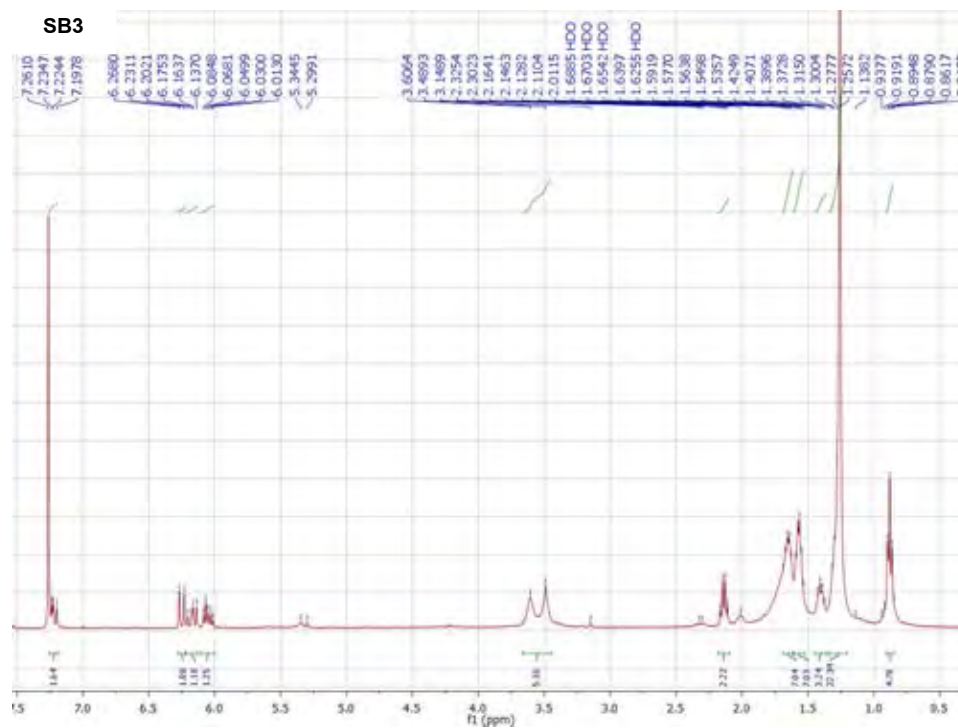
รูปที่ 3.6 โครงสร้างสาร **SB2**

3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **SB3**

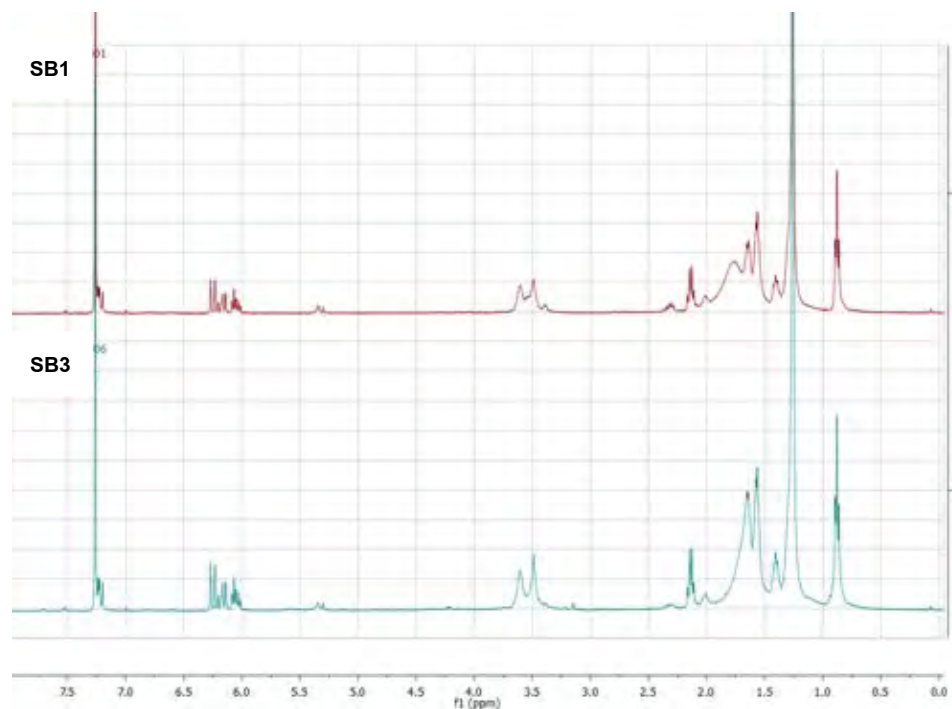
สาร **SB3** ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืดไม่มีสี จากข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.7 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่ δ_{H} 7.23 (1H, dd, $J = 10.0, 14.8$ Hz, H-3), 6.25 (1H, d, $J = 14.8$ Hz, H-2), 6.17 (1H, dd, $J = 10.0, 15.3$ Hz, H-4) และ 6.04 (1H, dt, $J = 6.7, 15.3$ Hz, H-5) สัญญาณโปรตอนของ methylene 20 สัญญาณที่ δ_{H} 2.13 (2H, m, H-6), 1.47 (2H, m, H-7) และ 1.26-1.35 (16H, m, H-8-H-15) สัญญาณโปรตอนของ piperidine ที่ δ_{H} 3.49, 3.61 (4H, brs, H-1', H-5'), 1.65 (2H, m, H-3') และ 1.57 (4H, m, H-2', H-4') และสัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl ที่ปลายโซ่ที่ δ_{H} 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16)

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ของ **SB3** กับ **SB1** (รูปที่ 3.8) พบว่ามีสัญญาณที่ใกล้เคียงกัน ต่างกันที่จำนวนของหมู่ methylene $[(\text{CH}_2)_n]$ จากข้อมูล HRESIMS พบไอออนพิกัดที่ (m/z) 320.2947 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (จากการคำนวณ $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{NO}$ ได้ 319.2875) ทำให้ทราบว่า **SB3** มีหมู่ methylene มากกว่า **SB1** อยู่ 2 หน่วย และจากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ของ **SB3** กับ 1-[(2*E*,4*E*)-1-oxo-2,4-hexadecadienyl]-piperidine พบว่ามีความใกล้เคียงกัน ทำให้สรุปได้ว่าสาร **SB3** คือ 1-[(2*E*,4*E*)-1-oxo-2,4-hexadecadienyl]-piperidine¹³ ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.9

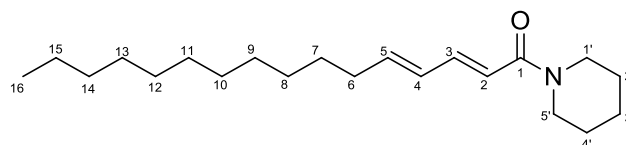
สารดังกล่าวเคยมีรายงานว่า แยกได้จากต้นตีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) แต่ยังไม่มียางานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



รูปที่ 3.7 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ **SB3**



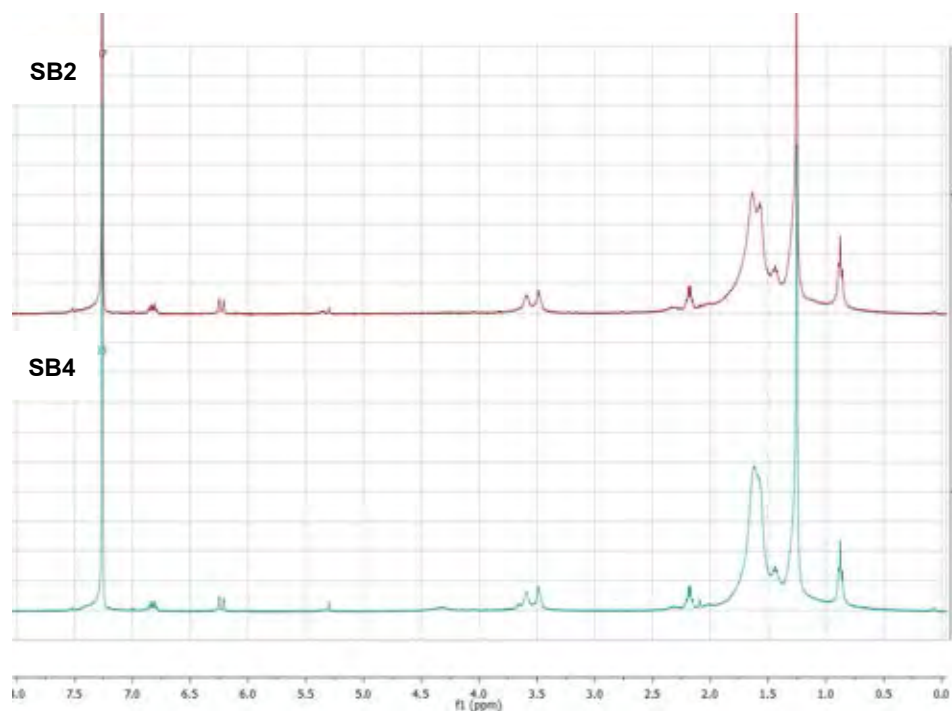
รูปที่ 3.8 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ **SB1** เทียบกับ **SB3**



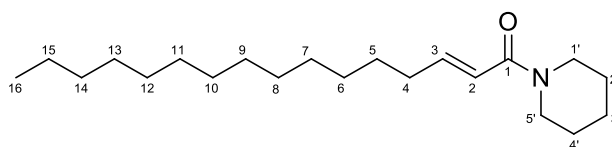
รูปที่ 3.9 โครงสร้างสาร **SB3**

3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **SB4**

สาร **SB4** ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืดไม่มีสี จากข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.10 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic ที่ δ_{H} 6.82 (1H, dt, $J = 7.0, 15.0$ Hz, H-3) และ 6.23 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2) สัญญาณโปรตอนของ methylene 24 สัญญาณที่ δ_{H} 2.18 (2H, m, H-4), 1.45 (2H, m, H-5) และ 1.26-1.35 (20H, m, H-6-H-15) สัญญาณโปรตอนของ piperidine ที่ δ_{H} 3.48, 3.59 (4H, brs, H-1', H-5'), 1.65 (2H, m, H-3') และ 1.57 (4H, m, H-2', H-4') และสัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl ที่ปลายโซ่ที่ δ_{H} 0.88 (3H, t, $J = 6.2$ Hz, H-16)



รูปที่ 3.11 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ **SB2** เทียบกับ **SB4**



รูปที่ 3.12 โครงสร้างสาร **SB4**

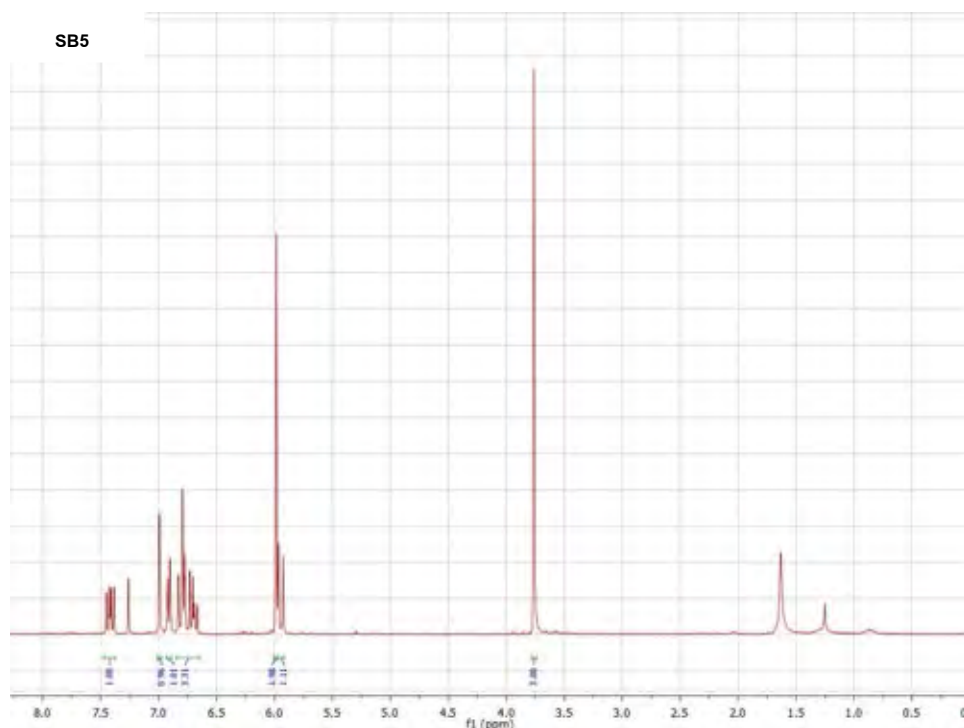
3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **SB5**

สาร **SB5** ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.13 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่ δ_{H} 7.42 (1H, dd, $J = 10.8, 15.2$ Hz, H-3), 6.81 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-5), 6.70 (1H, dd, $J = 10.8, 15.2$ Hz, H-4) และ 5.95 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-2) สัญญาณโปรตอนของ 3,4-methylene dioxyphenyl ที่ δ_{H} 6.99 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.91 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5') และ 5.98 (2H, s, H-7') และสัญญาณโปรตอนของ methoxy ที่ δ_{H} 3.75 (3H, s, OCH_3 -8')

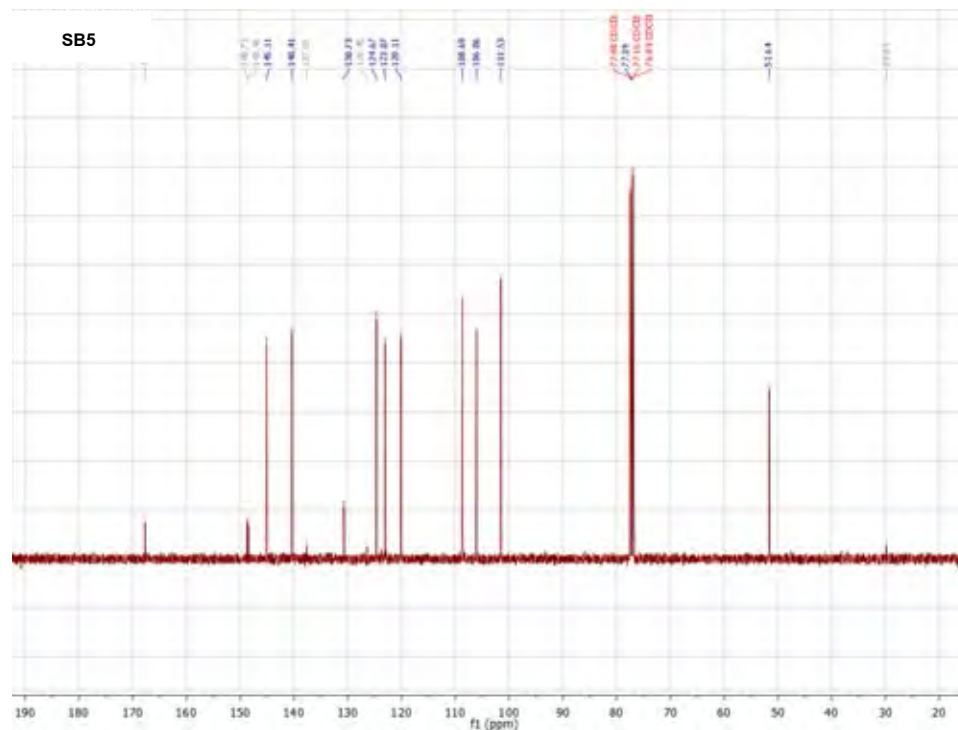
จาก ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) พบข้อมูล chemical shift (รูปที่ 3.14) ดังนี้ δ_{C} 167.7 (C-1), 148.7 (C-3'), 148.5 (C-4'), 145.1 (C-3), 140.4 (C-5) 130.7 (C-1'), 124.7 (C-4), 123.1 (C-6'), 120.1 (C-2), 108.7 (C-5'), 106.1 (C-2'), 101.5 (C-7'), 51.6 (C-8')

จากข้อมูล HMBC (ภาคผนวก) ของ H-2' (δ_{H} 6.99) ของ 3,4-methylene dioxyphenyl แสดงความสัมพันธ์กับ *trans*-conjugated diene ที่ C-5 (δ_{C} 140.4) และข้อมูล HMBC ของ H-3 (δ_{H} 7.42) ของ *trans*-conjugated diene และ methoxy proton (δ_{H} 3.75 (OCH_3 -8')) แสดงความสัมพันธ์กับ carbonyl carbon (δ_{C} 167.7) ทำให้สามารถเชื่อมต่อกับ methoxy เข้ากับ diene โดยผ่านพันธะเอสเทอร์ (ester bond) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากสเปกตรัม ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสาร **SB5** กับสาร methyl piperate พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **SB5** คือ methyl piperate ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.15

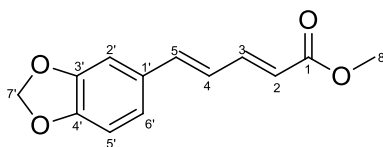
สารดังกล่าวเคยมีรายงานว่า แยกได้จากต้นตีปาลี (*Piper retrofractum* Vahl) จากรายงานของ Lee และคณะ (2007) สารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase-A (MAO-A) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.6 μM นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการแข่งขันอย่างมีประสิทธิภาพกับ MAO-B (IC_{50} : 1.6 μM) มากกว่า MAO-A (IC_{50} : 27.1 μM)¹⁶



รูปที่ 3.13 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของ **SB5**



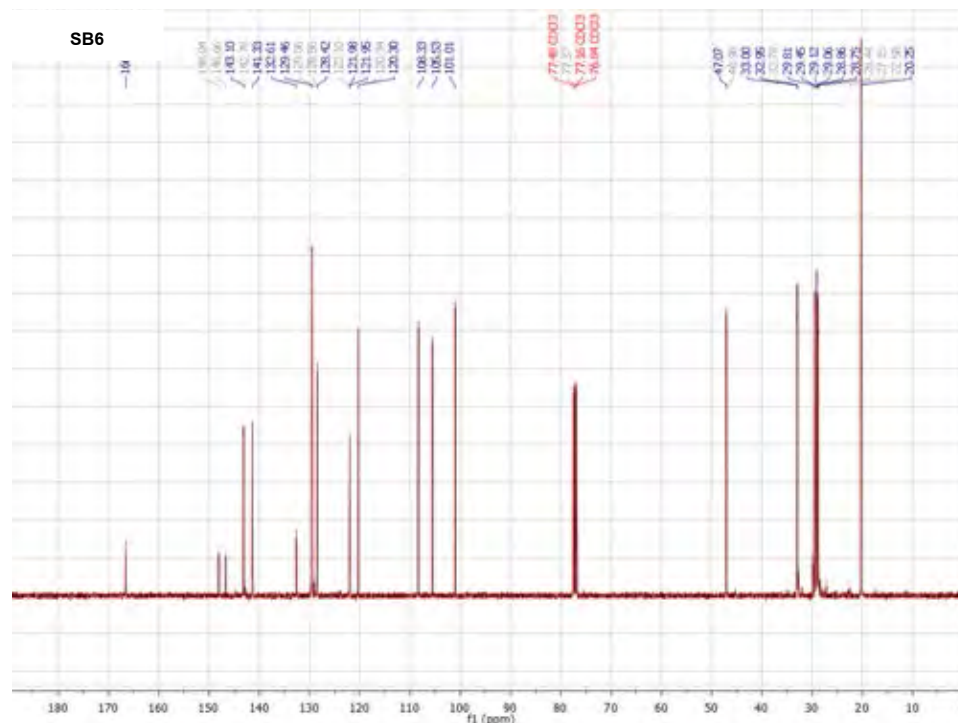
รูปที่ 3.14 ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) ของ SB5



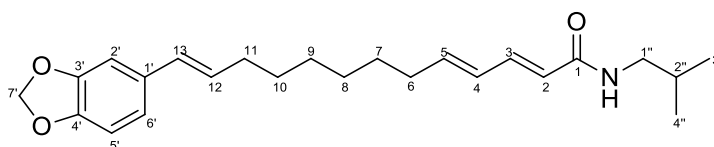
รูปที่ 3.15 โครงสร้างสาร SB5

3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB6

สาร **SB6** ลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีขาว จากข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.16 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่ δ_{H} 7.18 (1H, dd, $J = 10.8, 15.0$ Hz, H-3), 6.11 (1H, m, H-4) และ 6.06 (1H, m, H-5) สัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic ที่ δ_{H} 6.27 (1H, dd, $J = 15.0$ Hz, H-13), 6.03 (1H, dd, $J = 10.8, 15.0$ Hz, H-12) สัญญาณโปรตอนของ 3,4-methylene dioxyphenyl ที่ δ_{H} 6.88 (1H, brs, Hz, H-2'), 6.73 (2H, m, H-5', H-6') และ 5.92 (2H, s, H-7') สัญญาณโปรตอนของ isobutylamides ที่ δ_{H} 3.15 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 1.80 (1H, m, H-2'') และ 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3'', H-4'') สัญญาณโปรตอนของ methylene 12 สัญญาณ ที่ δ_{H} 2.15 (4H, m, H-6, H-11) และ 1.25-1.47 (8H, m, H-7-H-10)



รูปที่ 3.17 ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) ของ SB6



รูปที่ 3.18 โครงสร้างสาร SB6

3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร SB7

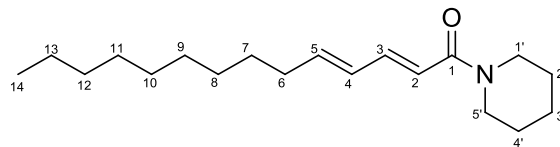
สาร **SB7** ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกใสสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ดังรูปที่ 3.19 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic 4 สัญญาณ ที่ δ_{H} 7.40 (1H, dd, $J = 10.0, 15.0$ Hz, H-3), 6.76 (1H, d, $J = 15$ Hz, H-5), 6.74 (1H, m, H-4) และ 6.43 (1H, d, $J = 15$, H-2) สัญญาณโปรตอนของ 3,4-methylene dioxyphenyl ที่ δ_{H} 6.98 (1H, brs, H-2'), 6.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', H-6') และ 5.97 (2H, s, H-7') และสัญญาณโปรตอนของ methylene 3 สัญญาณที่ δ_{H} 3.52, 3.62 (4H, brs, H-1'', H-5''), 1.66 (2H, m, H-3'') และ 1.58 (4H, m, H-2'', H-4'') และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจาก TLC และสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร **SB7**

บทที่ 4

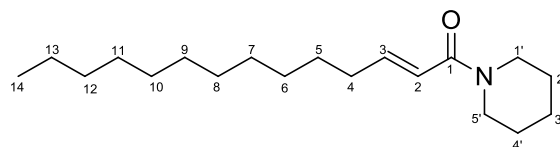
สรุปผลการทดลอง

จากการนำสิ่งสกัดเฮกเซนและเอทิลเอซิทेटของผลดีป्लीมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีพบว่า แยกได้สารที่เคยมีข้อมูลการรายงานมาก่อนหน้านี้ 7 ชนิด (รูปที่ 4.1) คือ *N*-[(2*E*,4*E*)-tetradecadienoyl]-piperidine (**SB1**), (2*E*) 1-(piperidin-1-yl)-tetradec-2-en-1-one (**SB2**), 1-[(2*E*,4*E*)-1-oxo-2,4-hexadecadienyl]-piperidine (**SB3**), piperlongimin B (**SB4**), methyl piperate (**SB5**), guineensine (**SB6**) และ piperine (**SB7**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้

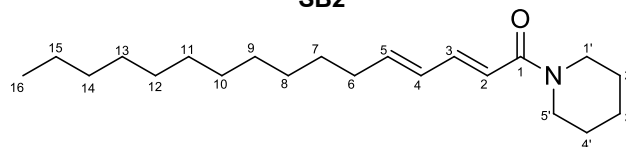
สาร **SB1** เป็นสารที่มีข้อมูลว่าเคยแยกได้จากต้น *Otanthus maritimus* แต่ไม่เคยมีข้อมูลว่าแยกได้จากต้นดีป्ली ส่วนสาร **SB2-SB7** เป็นสารที่มีข้อมูลว่าเคยแยกได้จากต้นดีป्लीแล้ว ดังนั้นสาร **SB1** จึงเป็นสารที่แยกจากต้นดีป्लीได้เป็นครั้งแรก



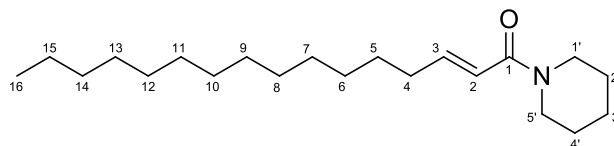
SB1



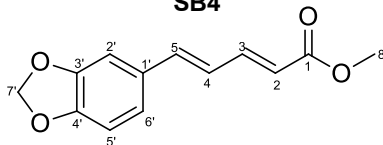
SB2



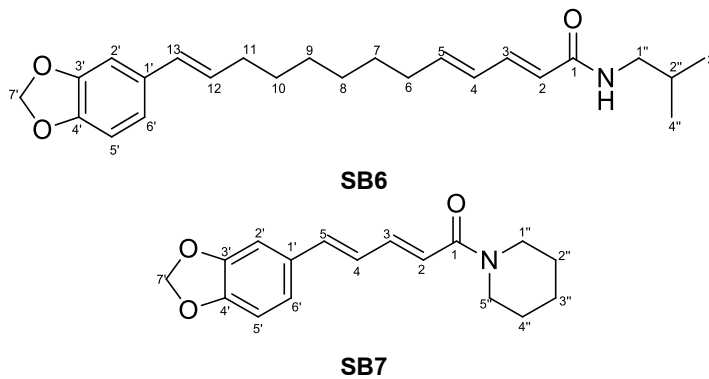
SB3



SB4



SB5



รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในสิ่งสกัดเฮกเซนและเอทิลแอสซิเทตมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการแยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้าง เนื่องจากเวลาจำกัด ดังนั้นควรแยกในส่วนนี้ต่อไป
2. ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดอื่น ๆ เช่น ไตโคลโรมีเทน เมทานอล เป็นต้น
3. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลเท่านั้น ดังนั้นควรมีการศึกษาร่องรอยทางเคมีจากส่วนอื่นที่น่าสนใจ เช่น ราก ใบ เป็นต้น
4. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

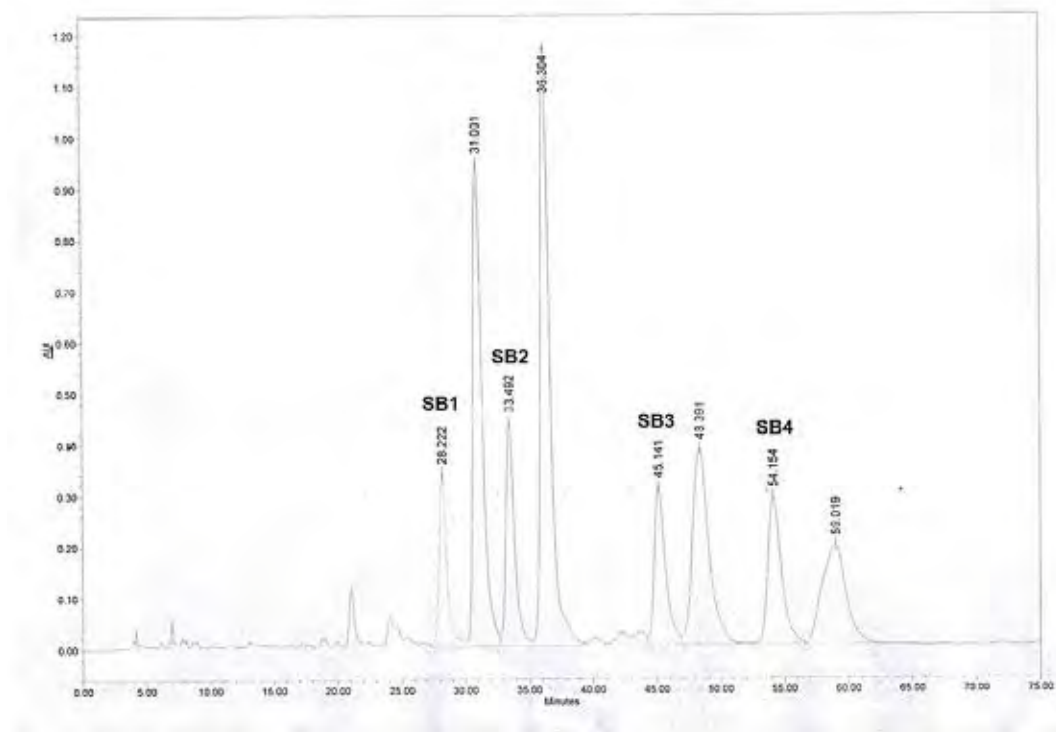
เอกสารอ้างอิง

1. Lim, T. K. In *Edible Medicinal and Non-medicinal Plants* In; Springer Science & Business: Netherlands, **2012**; Vol. 4, p 351.
2. Matsuda, H.; Ninomiya, K.; Morikawa, T.; Yasuda, D.; Yamaguchi, I.; Yoshikawa, M., Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on D-galactosamine/TNF-alpha-induced cell death in mouse hepatocytes. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18* (6), 2038-2042.
3. agriman. [online] ทีวีออนไลน์
<http://www.agriman.doae.go.th/home/news/year%202018/70-71dipli.pdf> (accessed 18 January 2019)
4. Sukkaphap-d. [online] ทีวีออนไลน์.
<https://sukkaphap-d.com/%E0%B8%94%E0%B8%B5%E0%B8%9B%E0%B8%A5%E0%B8%B5-%E0%B8%AA%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%9E%E0%B8%84%E0%B8%B8%E0%B8%93-%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B9%82%E0%B8%A2%E0%B8%8A%E0%B8%99%E0%B9%8C%E0%B8%82> (accessed 18 January 2019)
5. Phargarden. [online] ทีวีออนไลน์.
<http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=223> (accessed 18 January 2019)
6. Rao, V. R. S.; Suresh Kumar, G.; Sarma, V. U. M.; Satyanarayana Raju, S.; Hari Babu, K.; Suresh Babu, K.; Hari Babu, T.; Rekha, K.; Rao, J. M., Chabamides F and G, two novel dimeric alkaloids from the roots of *piper chaba* hunter. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (23), 2774-2777.
7. Rao, V. R. S.; Suresh, G.; Babu, K. S.; Raju, S. S.; Vishnu vardhan, M. V. P. S.; Ramakrishna, S.; Rao, J. M., Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. *Tetrahedron* **2011**, *67* (10), 1885-1892.
8. Jiang, Z. Y.; Liu, W. F.; Huang, C. G.; Huang, X. Z., New amide alkaloids from *Piper longum*. *Fitoterapia* **2013**, *84*, 222-226.

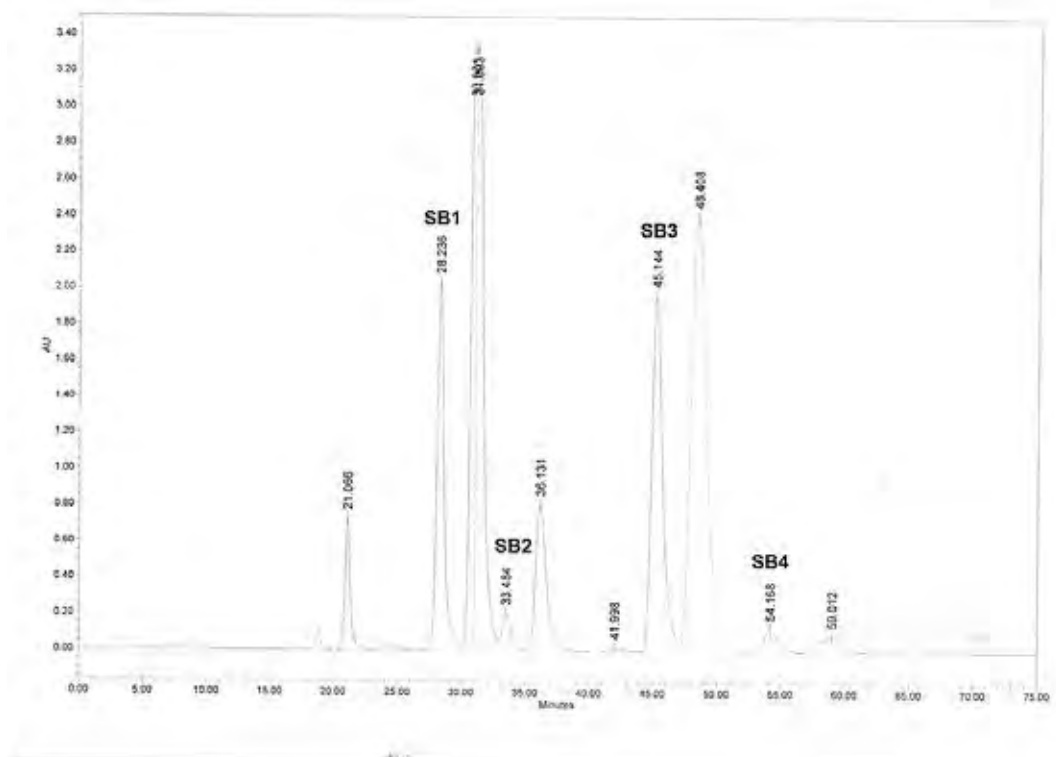
9. Luyen, B. T.; Tai, B. H.; Thao, N. P.; Yang, S. Y.; Cuong, N. M.; Kwon, Y. I.; Jang, H. D.; Kim, Y. H., A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (17), 4120-4124.
10. Muharini, R.; Liu, Z.; Lin, W.; Proksch, P., New amides from the fruits of *Piper retrofractum*. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (19), 2521-2525.
11. Abarbri, M.; Parrain, J.-L.; Duchêne, A., A Synthetic Approach to Natural Dienamides of Insecticidal Interest. *Synthetic Communications* **1998**, *28* (2), 239-249.
12. Christodouloupoulou, L.; Tsoukatou, M.; Tziveleka, L. A.; Vagias, C.; Petrakus, P. V.; Roussis, V., Piperidinyl amides with insecticidal activity from the maritime Plant *Otanthus maritimus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1435-1439.
13. Li, K.; Fan, Y.; Wang, H.; Fu, Q.; Jin, Y.; Liang, X., Qualitative and quantitative analysis of an alkaloid fraction from *Piper longum* L. using ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis* **2015**, *109*, 28-35.
14. Wiemann, J.; Karasch, J.; Loesche, A.; Heller, L.; Brandt, W.; Csuk, R., Piperlongumine B and analogs are promising and selective inhibitors for acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *139*, 222-231.
15. Mishra, P.; Sinha, S.; Guru, S. K.; Bhushan, S.; Vishwakarma, R. A.; Ghosal, S., Two new amides with cytotoxic activity from the fruits of *Piper longum*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2011**, *13* (2), 143-148.
16. Lee, S. A.; Hwang, J. S.; Han, X. H.; Lee, C.; Lee, M. H.; Choe, S. G.; Hong, S. S.; Lee, D.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y., Methylpiperate derivatives from *Piper longum* and their inhibition of monoamine oxidase. *Archives of Pharmacal Research* **2008**, *31* (6), 679-683.
17. Park, I-K.; Lee, S-G.; Shin S-C.; Park, J-D.; Ahn Y-J., Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1866-1870.
18. คำนึง สุขสกุล. การสังเคราะห์อนุพันธ์พิเพอรินด้วยปฏิกิริยาดีลส์แอลเดอร์ โดยใช้ซีโอไลต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. ปรินูญานิพนธ์ วท. บ. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2560

19. Shityakov, S.; Bigdelian, E.; Hussein, A. A.; Hussain, M. B.; Tripathi, Y. C.; Khan, M. U.; Shariati, M. A., Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**.

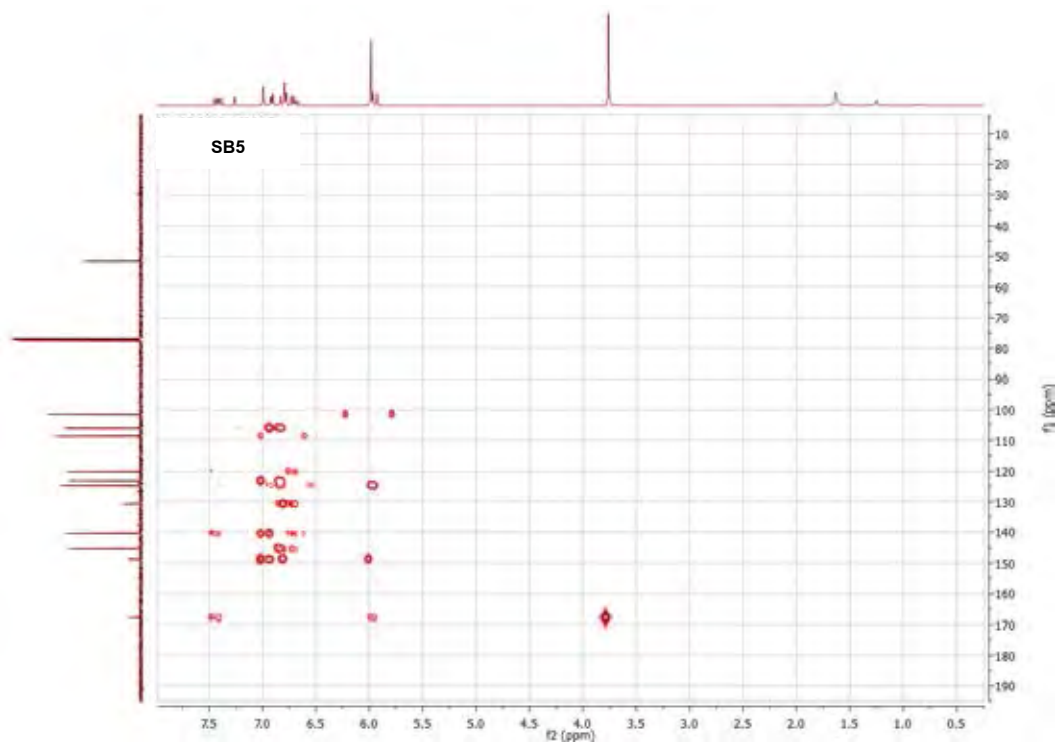
ภาคผนวก



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซนที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซนที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร



รูปที่ 3 สเปกตรัม HMBC ของ SB5

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวสุชานารถ บุญศรีสุข เกิดเมื่อวันที่ 26 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2539 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสตรีนนทบุรี จังหวัด นนทบุรี เมื่อปีการศึกษา 2557 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2558 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 5 ตำบลท่าทราย อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี รหัสไปรษณีย์ 11000 อีเมล sbpream@gmail.com