



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แอลคิลเอไมด์จากผลของดีป्लीและชะพลู  
Alkylamides from Fruits of *Piper retrofractum* and *Piper sarmentosum*

ชื่อนิสิต นางสาวพริญา ครุฑบำรุง เลขประจำตัว 5933079323  
ภาควิชา เคมี  
ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอลคิลเอไมด์จากผลของดีปลีและชะพลู

*Alkylamides from Fruits of Piper retrofractum and Piper sarmentosum*

โดย

นางสาวพริญา ครุฑบำรุง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ แอลคิลเอไมด์จากผลของดีปรีและชะพลู

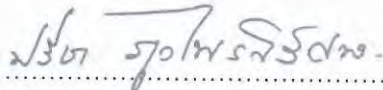
โดย นางสาวพริญา ครุฑบำรุง


ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิปกา สุขภิรมย์ ประธานกรรมการ
2. อาจารย์ ดร.ดวงกมล ตุงคะสมิต กรรมการ
3. รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิริศาล อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

  
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิริศาล)  
อาจารย์ที่ปรึกษา

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

วันที่ 19 เดือน พค. พ.ศ. 63

ชื่อโครงการ แอลคิลเอไมด์จากผลของตีป्लीและชะพลู  
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวพริญา ครุฑบำรุง เลขประจำตัว 5933079323  
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพริศริศาล  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

## บทคัดย่อ

สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลของพืชสองชนิดได้แก่ ผลตีป्ली (*Piper retrofractum*) และผลชะพลู (*Piper sarmentosum*) นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี แพลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี และ HPLC พบว่าสามารถแยกสารประกอบจากผลตีป्लीได้ 6 สาร ดังนี้ methyl piperate (**FK1**), (2E,4E,12E)-N-isobutyl-eicosa-2,4,12-trienamide (**FK2**), pellitorine (**FK3**), guineensine (**FK4**), pipericide (**FK5**) และ hydrocinamic acid (**FK6**) รวมทั้งสามารถแยกสารประกอบจากผลชะพลูได้ 1 สาร piperlotine-C (**FK7**) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ได้หาตำแหน่ง non-conjugated double bond ของสาร **FK2** ผ่านปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยไอโซน หรือไอโซโนไลซิส

สำคัญ: ตีป्ली, ชะพลู, แอลคิลเอไมด์, ปฏิกิริยาไอโซโนไลซิส

Project Title Alkylamides from Fruits of *Piper retrofractum* and *Piper sarmentosum*

Student Name Miss Fariya Khutbumrung Student ID 5933079323

Advisor Name Associate Professor Dr. Preecha Phuwapraisirisan

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

### Abstract

The dichloromethane extracts from fruits of *Piper retrofractum* and *Piper sarmentosum* were isolated using chromatography techniques such as silica gel column chromatography, flash column chromatography and HPLC. This led to the isolation of 6 compounds from *Piper retrofractum* named methyl piperate (**FK1**), (2E,4E,12E)-N-isobutyl-eicosa-2,4,12-trienamide (**FK2**), pellitorine (**FK3**), guineensine (**FK4**), pipericide (**FK5**) and hydrocinamic acid (**FK6**) together with one compound from *Piper sarmentosum* named piperlotine C (**FK7**). Their structures were determined by spectroscopic methods as well as comparison with previous reports in the literature. Moreover, the non-conjugated double bond position in compound **FK2** was determined by ozonolysis.

Key word: *Piper retrofractum*, *Piper sarmentosum*, Fruit, Alkylamide, ozonolysis

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยและรายงานฉบับนี้จะไม่สำเร็จล่วงไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูง ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรตริศา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา ถ่ายทอดประสบการณ์ความรู้ต่าง ๆ ตลอดจนปรับปรุงข้อบกพร่องในรายงานฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่จิตา ยอดสวัสดิ์ ที่ให้ความรู้ คอยช่วยเหลือ รวมไปถึงถ่ายทอดประสบการณ์ความรู้เทคนิคการทดลองต่าง ๆ รวมไปถึงปรับปรุงข้อบกพร่องในเล่มงานวิจัยนี้สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณกำลังใจจากเพื่อน ๆ ในภาคเคมีทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ และขอขอบคุณครอบครัวที่สนับสนุนในทุก ๆ เรื่อง และให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา ไม่กุดตันในการเรียน ทำให้ฉันสำเร็จล่วงในการเรียนและการทำงานวิจัยนี้ไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอุนุมัติ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญแผนภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจของโครงการ	1
1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	2
1.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตีปลี	2
1.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชะพลู	3
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ	14
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	14
บทที่ 2	15
การทดลองและผลการทดลอง	15
2.1 พืชตัวอย่าง	15
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	15
2.3 สารเคมี	16
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	16
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	17

2.5.1	ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	17
2.5.2	ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography)	18
2.5.3	เซฟาเด็กซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Sephadex LH-20 Column Chromatography)	19
2.5.4	ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)	19
2.6	การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	20
2.6.1	การสกัดผลดีป्ली	20
2.6.3	การสกัดผลชะพลู	21
2.7	การแยกสารประกอบ	21
2.7.1	การแยกสารประกอบจากผลดีป्ली	21
2.7.2	การแยกสารประกอบจากผลชะพลู	25
2.8	การทำปฏิกิริยาแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis)	26
บทที่ 3		31
	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	31
3.1	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK1	32
3.2	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK2	34
3.3	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK3	36
3.4	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK4	38
3.5	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK5	40
3.6	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK6	42
3.7	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK7	43
	สรุปผลการทดลอง	46
	ข้อเสนอแนะ	46
	เอกสารอ้างอิง	46
	ประวัติผู้วิจัย	48



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใบ และผลตีป्ली ( <i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	3
รูปที่ 1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใบ และผลชะพลู ( <i>Piper sarmentosum</i> Robx.)	4
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-14) จากผลตีป्ली	5
รูปที่ 1.4 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-3) จากผลตีป्ली	6
รูปที่ 1.5 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-3) จากผลตีป्ली	6
รูปที่ 1.6 โครงสร้างสารชนิดใหม่ (1-8) จากผลตีป्ली	7
รูปที่ 1.7 โครงสร้างสารประกอบ (1-5) จากใบ และผลของชะพลู	8
รูปที่ 1.8 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-12) จากผลชะพลู	10
รูปที่ 1.9 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-12) ที่สกัดจากใบชะพลู	11
รูปที่ 1.10 โครงสร้างสารประกอบ (1-16) จากรากชะพลู	13
รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) ของสารประกอบอัลคีน	27
รูปที่ 3.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของสารประกอบที่แยกได้จากผลตีป्लीและชะพลู	31
รูปที่ 3.2 <sup>1</sup> H NMR spectrum ของสารประกอบ <b>FK1</b>	32
รูปที่ 3.3 <sup>13</sup> C NMR spectrum ของสาร <b>FK1</b>	32
รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร <b>FK1</b>	33
รูปที่ 3.5 <sup>1</sup> H NMR spectrum ของสาร <b>FK2</b>	34
รูปที่ 3.6 <sup>13</sup> C NMR spectrum ของสาร <b>FK2</b>	34
รูปที่ 3.7 โครงสร้างเคมีของสาร <b>FK2</b>	35
รูปที่ 3.8 <sup>1</sup> H NMR spectrum ของสาร <b>FK3</b>	36
รูปที่ 3.9 <sup>13</sup> C NMR spectrum ของสาร <b>FK3</b>	36
รูปที่ 3.10 โครงสร้างเคมีของสาร <b>FK3</b>	37
รูปที่ 3.11 <sup>1</sup> H NMR spectrum ของสาร <b>FK4</b>	38
รูปที่ 3.12 <sup>13</sup> C NMR spectrum ของสาร <b>FK4</b>	38
รูปที่ 3.13 โครงสร้างเคมีของสาร <b>FK4</b>	39
รูปที่ 3.14 <sup>1</sup> H NMR spectrum ของสาร <b>FK5</b>	40
รูปที่ 3.15 <sup>13</sup> C NMR spectrum ของสาร <b>FK5</b>	40

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.16 โครงสร้างเคมีของสาร <b>FK5</b>	41
รูปที่ 3.17 $^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร <b>FK6</b>	41
รูปที่ 3.18 $^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร <b>FK6</b>	42
รูปที่ 3.19 โครงสร้างเคมีของสาร <b>FK6</b>	42
รูปที่ 3.20 $^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร <b>FK7</b>	43
รูปที่ 3.21 $^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร <b>FK7</b>	43
รูปที่ 3.22 โครงสร้างเคมีของสาร <b>FK7</b>	44
รูปที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากผลของดีป्लीและชะพลู	45

## สารบัญแผนภาพ

	หน้า
แผนภาพที่ 2.1 การสกัดผลดีปี้ (Piper retrofractum)	21
แผนภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสกัดผลชะพลู (Piper sarmentosum)	21
แผนภาพที่ 2.3 การแยกสารประกอบของผลดีปี้ (Piper retrofractum)	28
แผนภาพที่ 2.4 การแยกสารประกอบของผลดีปี้ (Piper retrofractum)	29
แผนภาพที่ 2.5 การแยกสารประกอบของผลชะพลู (Piper sarmentosum)	30

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

UV	ultraviolet
TLC	thin layer chromatography
NMR	nuclear magnetic resonance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography:
$^1\text{H}$ NMR	proton nuclear magnetic resonance
$^{13}\text{C}$ NMR	carbon nuclear magnetic resonance
$\text{CDCl}_3$	deuterated chloroform
$\delta_{\text{H}}$	chemical shift of proton (NMR)
$\delta_{\text{C}}$	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)

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจของโครงการ

พรรณพฤกษชาติวงศ์พริกไทย (Piperaceae) เป็นวงศ์ของพืชมีดอกกลุ่มใหญ่ที่พบได้อย่างกว้างขวางในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยส่วนใหญ่สกุลที่พบทั่วไปคือ *Piper* ที่มีสายพันธุ์มากกว่า 1 พันสปีชีส์ขึ้นไป ชนิดของพืชที่คนทั่วไปรู้จักกันดีได้แก่ พริกไทย พลู ชะพลู และ ดีปลี เป็นต้น ซึ่งโดยส่วนมากพืชที่กล่าวมาข้างต้นจะถูกนำไปใช้สำหรับประกอบอาหารหรือเป็นเครื่องเทศที่ทำให้มีรสเผ็ดร้อนแทนพริก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของพรรณพืชชนิดนี้ ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) มีการรายงานว่าถูกนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร<sup>[1]</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของดีปลีในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสที่ใช้ในการบำบัดโรคเบาหวาน<sup>[2]</sup> ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกชักนำจากความเครียด (stress-induced gastric ulcers) โดยเทียบกับยาโอเมพราโซล (Omeprazole) ที่เป็นยาลดกรดหรือลดแผลในกระเพาะอาหารด้วย<sup>[3]</sup> นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า สารที่สกัดจากชะพลูมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อพลาสโมเดียม (antiplasmodial activity) ที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (antituberculosis activity)<sup>[4]</sup>

ปัจจุบันมีการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีในดีปลีและชะพลูจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบแอลคิลเอไมด์ (Alkylamide) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) อย่างเช่น Piperine เป็นสารประกอบเอไมด์ที่พบมากที่สุดในพื้นที่ซึ่งมีงานวิจัยได้ศึกษาประโยชน์และการนำไปใช้พบว่า Piperine มีผลสำเร็จในการทำเป็นยาบำบัด และที่สำคัญสามารถเป็นเคมีบำบัดเพื่อการเพิ่มคุณภาพของชีวปริมาณสารออกฤทธิ์ (Bioavailability)<sup>[5]</sup> จะเห็นได้ว่าเริ่มมีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม สารสกัดธรรมชาติล้วนแสดงศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นสารเคมีที่มีความปลอดภัย มีประสิทธิภาพ ลดการใช้สารเคมีอันตราย แต่เนื่องจากงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดดีปลีและชะพลูล้วนแต่เป็นงานวิจัยเก่าที่ถูกตีพิมพ์เมื่อหลายปีมาแล้ว ทำให้ดิฉันมีความสนใจที่จะศึกษางานวิจัยนี้เพื่อเป็นการอัปเดตข้อมูลให้ทันสมัย หรือเพื่อค้นหาสารใหม่ๆ ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ในงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาสารประกอบแอลคิลเอไมด์ในผลของดีปลีและชะพลู ซึ่งสารประกอบที่สนใจจะมีลักษณะเป็นแอลคิลเอไมด์สายยาว จากการนำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR ถ้าสารประกอบนี้มีพันธะคู่บริเวณสายยาว (non-conjugated double bond) เทคนิค NMR ไม่สามารถวิเคราะห์ตำแหน่งของพันธะคู่ได้อย่างชัดเจน ทำให้ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาโครงสร้างที่แท้จริงของสารประกอบแอลคิลเอไมด์ที่มีพันธะคู่โดยการทำปฏิกิริยาแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) ซึ่งมีงานวิจัยได้ศึกษาตำแหน่งของพันธะคู่ด้วยวิธีนี้

ก่อนหน้าแล้วโดยการตัดพันธะคู่ให้กลายเป็นสารประกอบแอลดีไฮด์<sup>[6]</sup> เมื่อได้สารบริสุทธิ์และรู้โครงสร้างที่แน่นอนแล้วจึงนำสารเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

## 1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

### 1.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดีป्ली

ดีป्ली (Long pepper, Indain long pepper) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Piper retrofractum* Vahl. จัดอยู่ในพืชวงศ์ Piperaceae ซึ่งเป็นสมุนไพรเก่าแก่ที่มีแหล่งเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ที่ประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซีย มีลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง ขึ้นเลื้อยพัน ลำต้นค่อนข้างกลมเรียบ เปราะ หักง่าย บริเวณข้อมีรากสำหรับยึดเกาะ แตกกิ่งก้านมาก ใบ เป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับตามข้อใบ 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 ดอกเป็นช่อตั้งตรงข้ามกับใบ ออกเป็นช่อจากง่ามใบ หรือปลายยอด มีดอกย่อยเรียงกันอัดแน่นบนแกนช่อลักษณะเป็นแท่งกลมยาวทรงกระบอก ปลายเรียวมน ยาวประมาณ 1-2 นิ้ว สีเขียว เมื่อแก่มีสีเหลืองอมแดง มีขนปกคลุมเล็กน้อย ไม่มีก้านดอกย่อย ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก ก้านช่อดอกยาวเท่ากับก้านใบ ช่อดอกเพศผู้ยาว 4-5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. ก้านดอกยาว 2-3.5 ซม. มีเกสรเพศผู้ 2-3 อัน ช่อดอกเพศเมีย ยาว 3-4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. ผลสดอัดกันแน่นบนแกนช่อ ยาว 2.5-5 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร โคนกว้าง ปลายมน ผิวผลเรียบ ผลย่อยขนาดเล็กจะติดกันเป็นแท่งหลอมรวมกัน แยกจากกันไม่ได้ ผลมีรสเผ็ดร้อน มีสีเขียวเมื่อสุกสีน้ำตาลแกมแดง ผลย่อยมีเมล็ดเดี่ยว เมล็ดมีขนาดเล็กมาก กลมและแข็ง<sup>[7]</sup>



รูปที่ 1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใบ และผลดีป्ली (*Piper retrofractum* Vahl.)

อ้างอิงจาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=223>

### 1.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชะพลู

ชะพลู (Wildbetel Leafbush) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Piper sarmentosum* Roxb. เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae พบในเขตร้อนของทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทางตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย และตอนใต้ของจีนไกลถึงหมู่เกาะอันดามัน มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุกหรือไม้พุ่มเตี้ย เป็นไม้พันอาศัย หรือเถาทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน ปลายยอดตั้งขึ้น ลำต้น สีเขียวกลม มีข้อเป็นปม สูง 30-80 เซนติเมตร มีไหลงอกเป็นต้นใหม่ได้ ใบมีกลิ่นหอมเฉพาะ ต้นและใบมีรสเผ็ดซ่าเล็กน้อย ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ กว้าง 5-10 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร สีเขียวเข้ม ผิวใบเป็นมันลื่น แผ่นใบบาง หลังใบและท้องใบเรียบ ตัวใบรูปหัวใจ ตัวใบตามยอดรูปขอบขนาน โคนใบเบี้ยว ปลายใบแหลม ตอนล่างของลำต้น ขอบใบเรียบ ด้านหลังใบมีขนตามเส้นใบ มีเส้นแขนงใบ 7 เส้น เห็นชัดเจน ใบช่วงล่างใหญ่กว่าใบยอดกิ่ง ก้านใบยาว 1-3 เซนติเมตร ดอก เป็นช่อออกตามซอกใบและตามปลายยอด ดอกขนาดเล็กอัดเรียงกันเป็นช่อรูปทรงกระบอก ตั้งตรง ปลายมน คล้ายดอกทีปสีแต่สั้นกว่า ดอกย่อยแยกเพศ ช่อดอกตัวเมียยาว 6-8 มิลลิเมตร ช่อดอกตัวผู้ยาว ก้านช่อดอกยาว 1-2.5 เซนติเมตร ดอกย่อยมีขนาดเล็กมาก กลีบดอกสีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ผล เป็นผลสดสีเขียวเป็นกลุ่ม ลักษณะกลม ผิวมัน อัดกันแน่นอยู่บนแกน เมล็ดมีขนาดเล็ก ชอบขึ้นตามที่ชื้นบริเวณโคนต้นไม้ใหญ่ หรือที่ร่มรำไร ออกดอกและติดผลราวเดือนมีนาคมถึงกันยายน ใบรับประทานเป็นผัก มีเบตาแคโรทีนสูง หรือใช้ห่อรับประทานกับเมี่ยงคำ<sup>[8]</sup>



รูปที่ 1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใบ และผลชะพลู (*Piper sarmentosum* Robx.)

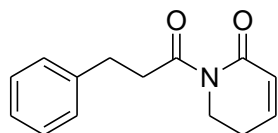
อ้างอิงจาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=221>

### 1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

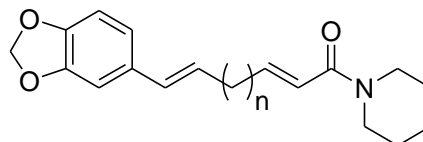
จากการสืบค้นรายงานองค์ประกอบทางเคมีของผลดีป्ली พบว่า มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับผลจำนวนมาก โดยพบว่าองค์ประกอบทางเคมีจากผลดีป्लीเป็นสารในกลุ่มเอคิลเอไมด์ โพลีโพรพานอยด์ (polypropanoids) และสารในกลุ่มกลูโคไซด์ ตัวอย่างเช่น

Toshio และ คณะ (2003) ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารจากผลดีป्ली (*Piper chaba*) โดยในงานวิจัยนี้ได้นำผลดีป्लीมาสกัดด้วย 80% อะซิโตน สามารถแยกสารประกอบเอไมด์ชนิดใหม่ จำนวน 4 สาร คือ piperchabamides A-D (1-4) โดยมีโครงสร้างดังรูปที่ 1.3 และนำสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วอีก 10 สาร ได้แก่ piperine (5), piperanine (6), pipernonaline (7), dehydropipernonaline (8), piperlonguminine (9), retrofractamide B (10), guineensine (11), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-octadecadienamide (12), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosatrienamide (13) และ methypiperate (14) โดยนำสารทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกชักนำโดยเอทานอล (ethanol-induced gastric lesions) ในหนูที่ขนาดความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ 5, 7, 8, 10, 12 และ 13 มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกชักนำด้วยยาอินโดเมทาซิน (indomethacin-induced gastric lesions) ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน<sup>[1]</sup>

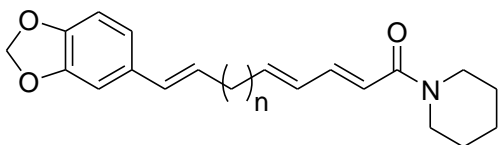




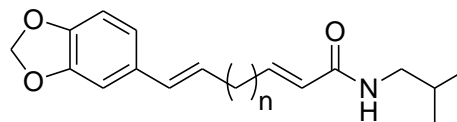
piperchabamide A (1)



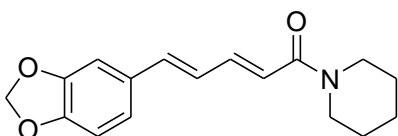
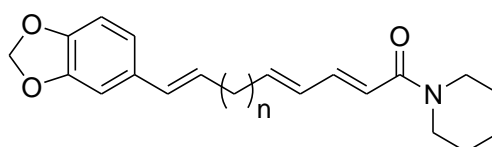
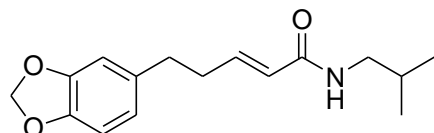
n = 6 piperchabamide B (2)



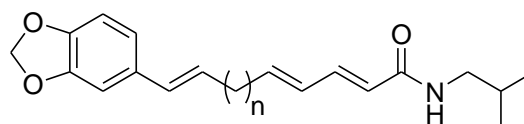
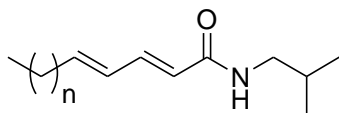
n = 6 piperchabamide C (3)



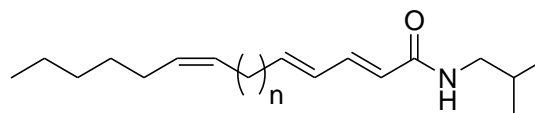
n = 6 piperchabamide D (4)

4E: piperine (5)  
4,5-dihydro: piperanine (6)n = 2; 4,5-dihydro: piperonaline (7)  
n = 2: dehydropiperonaline (8)

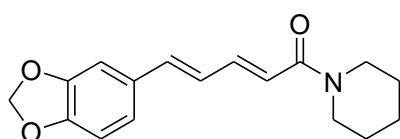
4E: piperlonguminine (9)

n = 4: retrofractamide B (10)  
n = 6: guineensine (11)

n = 12: (2E,4E)-N-isobutyleicosa-2,4-dienamide (12)



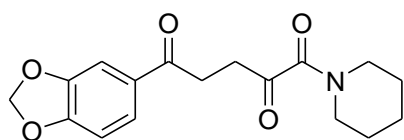
n = 8: (2E, 4E, 12Z)-N-isobutyleicosa-2,4-12-eicosatrienamide (13)



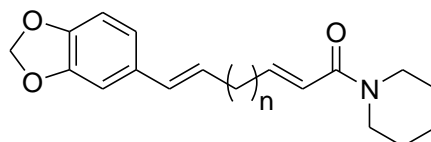
methyl piperate (14)

**รูปที่ 1.3** โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-14) จากผลดีป्लीโดย Toshio และ คณะ (2003)

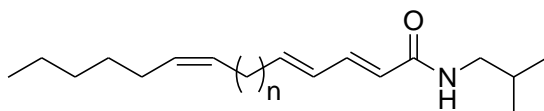
Kubo และ คณะ (2013) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลดีป्ली (*P. retrofractum*) สามารถแยกสารชนิดใหม่ จำนวน 3 สาร คือ piperodione (1), (2E,12E)-pipertrided-cadienamide (2) และ N-isobutyl-(2E,4E,10Z)-hexadeca-2,4,10-trienamide (3) ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 1.4 และได้นำสารทั้ง 3 ชนิด และ piperine มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ neurotrophic activity พบว่ามีเพียงสาร piperodione ที่มีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญของนิวไรท์ของ NGF-mediated PC12 cells ในช่วงความเข้มข้น 0.1-10 ไมโครโมลาร์<sup>[9]</sup>



piperodione (1)

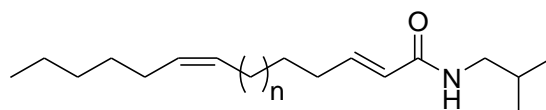


(2E,12E)-pipertridecadienamide (2)

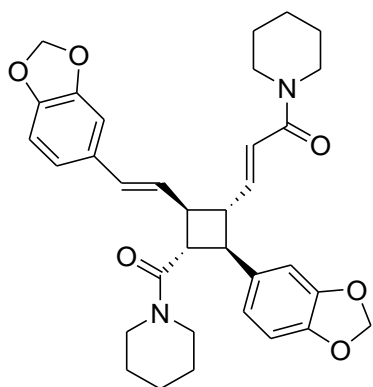
n = 4: N-isobutyl-(2E,4E,8Z)-  
tetradeca-2,4,10-trienamide (3)

**รูปที่ 1.4** โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-3) จากผลดีป्लीโดย Kubo และ คณะ (2013)

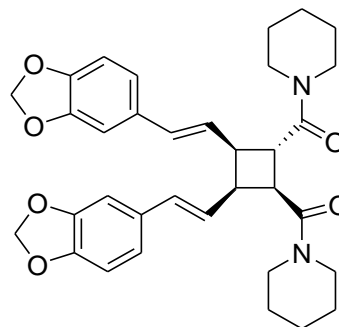
Muharini และ คณะ (2015) ทำการศึกษาสารประกอบเอไมด์ชนิดใหม่จากผลดีป्ली (*P. retroractum*) โดยสามารถแยกสารชนิดใหม่จำนวน 3 สาร ได้แก่ (2E,14Z)-N-isobutyleicosa-2,14-dienamide (1), dipiperamides F และ G (2 และ 3) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.5 นำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (antifungal activity) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) พบว่า สารเหล่านี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา นอกจากนี้ สาร dipiperamides F และ G (2 และ 3) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมเหง้าเหลือง L5178Y ในหนูโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 10.0, 13.9 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ<sup>[10]</sup>



n = 8: (2E, 14Z)-N-isobutyleicosa-2,14-dienamide



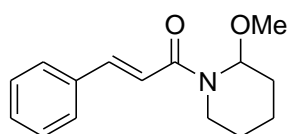
dipiperamide F



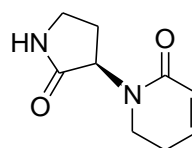
dipiperamide G

**รูปที่ 1.5** โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-3) จากผลดีป्लीโดย Muharini และ คณะ (2015)

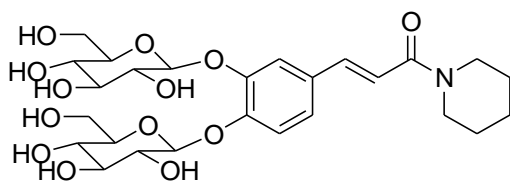
Tang และ คณะ (2019) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลดีปาลี (*Piper retrofractum*) ซึ่งสามารถแยกสารประกอบเอไมด์ได้ 2 สาร คือ (*E*)-*N*-cinnamoyl-2-methoxypiperidine (1) และ (*R*)-1-(2-oxopyrrolidin-3-yl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one (2) แยกสารประกอบเอไมด์กลูโคไซด์ จำนวน 4 สาร คือ retrofractosides A-D (3-6) และ สารประกอบฟีนิลโพรพานอยกกลูโคไซด์ จำนวน 2 สาร คือ retrofractosides E- F (7-8) ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 1.6 นำสารทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหนูที่ถูกชักนำด้วยเปปไทด์ AYPGKF-NH<sub>2</sub> พบว่า สารเหล่านี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหนูที่ถูกชักนำด้วยเปปไทด์ AYPGKF-NH<sub>2</sub> [11]



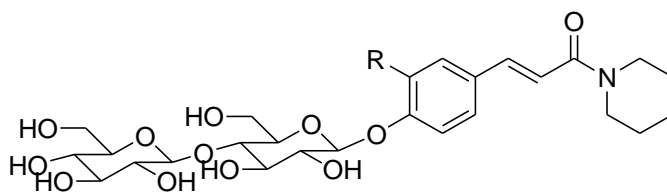
(*E*)-*N*-cinnamoyl-2-methoxypiperidine



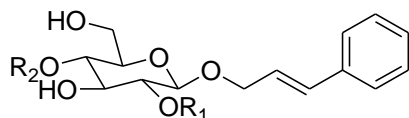
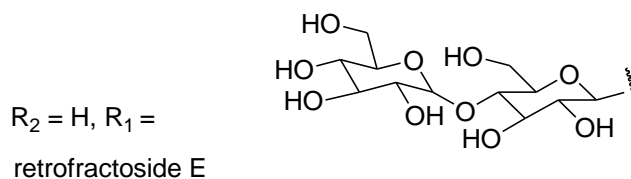
(*R*)-1-(2-oxopyrrolidin-3-yl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one



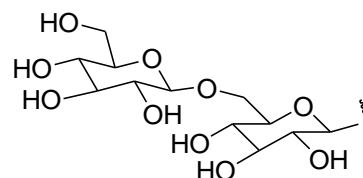
2*Z*: retrofractoside A  
2*E*: retrofractoside B



R = H: retrofractoside C  
R = OMe: retrofractoside D



$R_1 = H, R_2 =$   
retrofractoside F

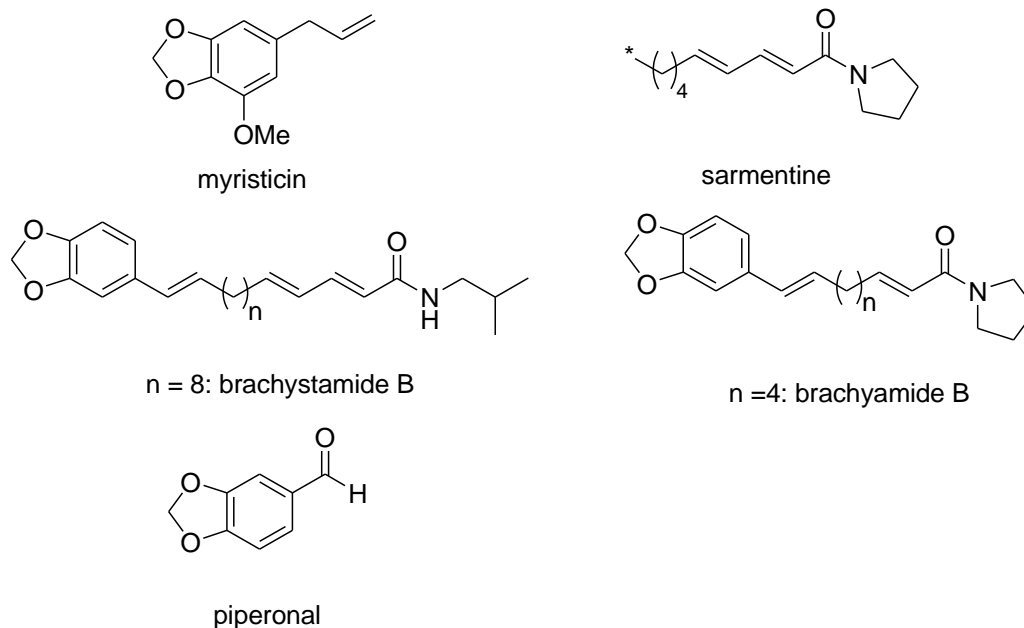


รูปที่ 1.6 โครงสร้างสารชนิดใหม่ (1-8) จากผลดีปาลีโดย Tang และ คณะ (2019)

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลชะพลู

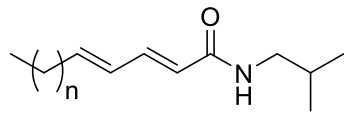
จากการสืบค้นรายงานองค์ประกอบทางเคมีของผลชะพลู พบว่า มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับผลชะพลู 2 ฉบับ โดยพบว่าองค์ประกอบทางเคมีบางส่วนจากผลของชะพลูคล้ายกับองค์ประกอบทางเคมีจากผลดีป्लीซึ่งเป็นสารในกลุ่มเอคิลเอไมด์ โพลีโพรพานอยด์ (polypropanoids) และจากการสืบค้นเพิ่มเติมในส่วนของใบและรากชะพลู พบว่าองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารในกลุ่มเอคิลเอไมด์ โพลีโพรพานอยด์ เทอร์พีน (terpene) และ ลิกแนน (lignan) ตัวอย่างเช่น

Chanprapai และ Chavasiri (2017) ได้ทำการวิจัยฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์จากชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราในข้าว โดยได้นำส่วนของใบ ผล ลำต้นชะพลูมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และเมทานอล สามารถแยกสารที่มีการรายงานโครงสร้างจำนวน 5 สาร จากใบ 1 สาร คือ myristicin (1) และจากผลชะพลูจำนวน 4 สาร คือ sarmentine (2), brachystamide B (3), brachyamide B (4) และ piperonal (5) ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1.7 นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหย (essential oils) ที่สกัดได้จากใบชะพลูมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น myristicin หลังจากนั้นนักวิจัยได้นำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยแบคทีเรียที่นำมาศึกษามี 2 ชนิดคือ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) และ pv. *oryzicola* (Xoc) ในส่วนของเชื้อรา มี 2 ชนิดคือ *Rhizoctonia solani* และ *Bipolaris oryzae* พบว่า myristicin และ brachyamide B มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* และ *B. oryzae* ได้สูงที่สุดด้วย  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.69 และ 0.12 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ brachyamide B และ piperonal มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย Xoo ด้วย MIC/MBC เท่ากับ 7.62/1.90 มิลลิโมลต่อลิตร และ Xoc ด้วย MIC/MBC เท่ากับ 2.59/0.75 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ สรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในข้าวจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราในข้าว<sup>[12]</sup>

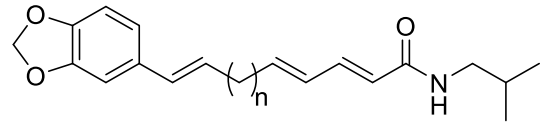
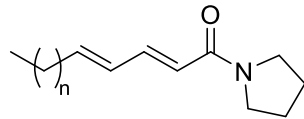


**รูปที่ 1.7** โครงสร้างสาร (1-5) จากใบและผลของชะพลู โดย Chanprapai และ คณะ (2017)

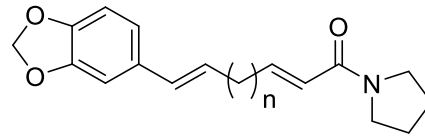
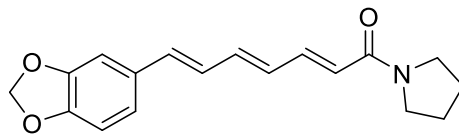
Rukachaisirikul และ คณะ (2004) ได้ทำการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลชะพลู (*Piper sarmentosum*) โดยสามารถแยกสารประกอบเอไมด์ทั้งหมด 8 ชนิด pellitorine (1), guineensine (2), brachystamide B (3), sarmentosine (4), brachyamide B (5), 1-piperetyl pyrrolidine (6), 3',4',5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine (7) และ sarmentosine (8) สารประกอบลิแกนด์ 2 ชนิด (+)-asarinin (9) และ sesamin (10) สารประกอบอื่นอีก 4 ชนิด 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1E-tetradecene (11), methyl piperate (12), สารผสม  $\beta$ -sitosterol (13) และ stigmasterol (14) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.8 นอกจากนี้ สารประกอบ 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 และ 12 เป็นที่สารไม่เคยมีงานวิจัยรายงานมาก่อนในพืชชนิดนี้ นักวิจัยนำองค์ประกอบเคมีทั้ง 14 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อวัณโรค (antituberculosis activity) และยับยั้งเชื้อพลาสโมเดียมที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย (antiplasmodial activity) พบว่าสารประกอบชนิด sarmentosine (4) และ 1-piperetyl pyrrolidine (6) มีฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสองอย่างที่กล่าวข้างต้น ในขณะที่สารประกอบ pellitorine (1), guineensine (2), brachyamide B (5), sarmentosine (8) และ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1E-tetradecene (11) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคเท่านั้น<sup>[4]</sup>



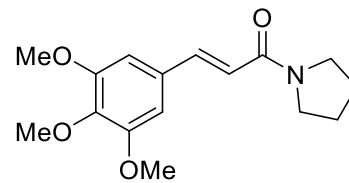
n=4: pellitorine (1)

n=6: guineensine (2)  
n=8: brachystamide B (3)

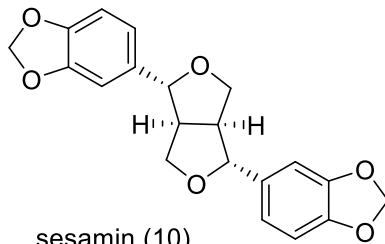
n=4: sarmentine (4)

n=4: brachyamide B (5)  
n=2: sarmentosine (8)

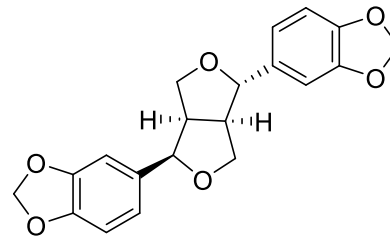
1-piperetyl pyrrolidine (6)



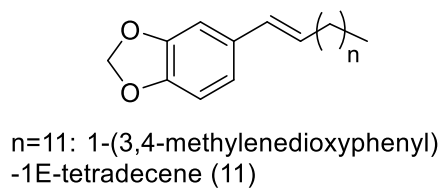
3,4,5,-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine (7)



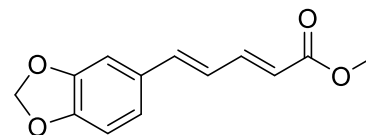
sesamin (10)



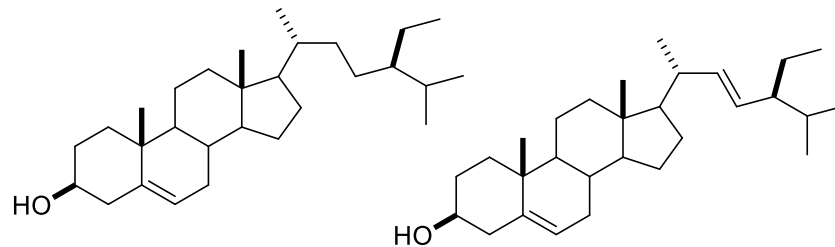
(+) -asarinin (9)



n=11: 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1E-tetradecene (11)



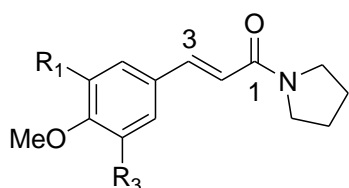
Methyl piperate (12)



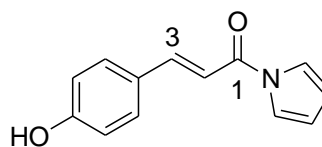
Mixture of B-sitosterol (13) and stigmasterol (14)

รูปที่ 1.8 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-12) จากผลชะพลู โดย Rukachaisirikul และคณะ (2004)

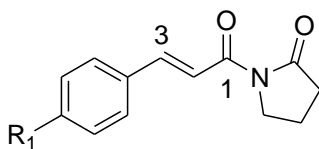
Li และ คณะ (2007) ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากใบชะพลู (*Piper lolot*) สามารถแยกสารประกอบเอไมด์ชนิดใหม่จำนวน 12 สาร คือ piperlotine A-L (1-12) ดังรูปที่ 1.9 แล้วนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเพื่อป้องกันการอุดตันในหลอดเลือดในกระต่าย พบว่า piperlotine A (1), piperotine C (3), piperlotine D (4), piperotine E (5) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด<sup>[13]</sup>



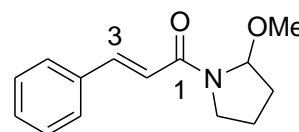
- 2E: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = OMe piperlotine A (1)  
 2Z: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = OMe piperlotine B (2)  
 2E: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>2</sub> = OMe piperlotine C (3)  
 2Z: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>2</sub> = OMe piperlotine D (4)



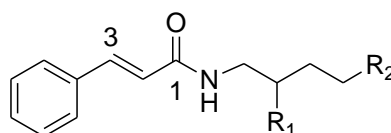
piperlotine E (5)



- 2E: R<sub>1</sub> = H piperlotine F (6)  
 2E: R<sub>1</sub> = OMe piperlotine G (7)  
 2Z: R<sub>1</sub> = OMe piperlotine H (8)



piperlotine I (9)



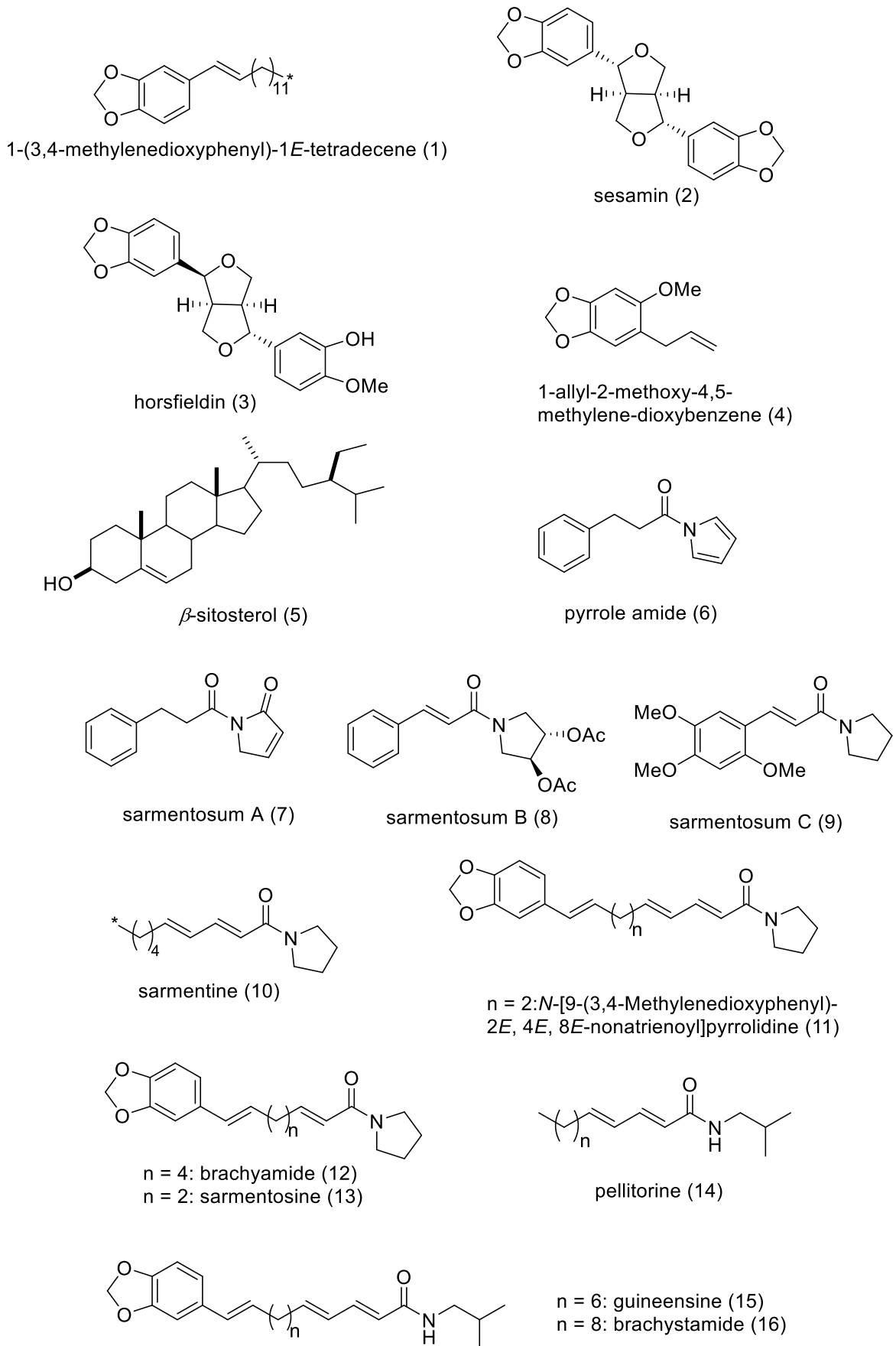
- R<sub>1</sub> = OAc, R<sub>2</sub> = OH piperlotine J (10)  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH piperlotine K (11)  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OAc piperlotine L (12)

รูปที่ 1.9 โครงสร้างสารประกอบเอไมด์ (1-12) ที่สกัดจากใบชะพลู โดย Li และ คณะ (2007)

Tuntiwachwuttikul และ คณะ (2006) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากชะพลู (*Piper sarmentosum*) สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 16 สาร โดยเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่จำนวน 3 สาร คือ sarmentosum A, B และ C (7-9) สารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 7 สาร คือ aromatic alkene (1), 1-allyl-2-methoxy-4,5-methylene-dioxybenzene (4),  $\beta$ -sitosterol (5), pyrrole amide (6), sarmentine (10), sarmentosine (13) และ pellitorine (14)

และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วที่แยกได้จากชะพลูเป็นครั้งแรก จำนวน 6 สาร ได้แก่ (+)-sesamin (2), horsfieldin (3), two pyrrolidine amides (11 และ 12), guineensine (15) และ brachstamide B (16) ดังรูปที่ 1.10 นำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อพลาสโมเดียมที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย (antiplasmodial activity) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antimycobacterial activity) และฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity) พบว่า สารประกอบเอไมด์ชนิดใหม่ ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่กล่าวมาข้างต้น ในขณะที่ sarmentine (10) และ sarmentosine (13) มีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ 4.5 และ 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ aromatic alkene (1) และ (2*E*,4*E*,8*E*)-9-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-(1-pyrrolidinyl)-2,4,8-nonatrien-1-one (11) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยมีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารประกอบ sarmentine (10), brachyamide B (12), sarmentosine (13), pellitorine (14) และ brachystamide B (16) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้แก่ brachyamide B (12) และ sarmentosine (13) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 41.82 และ 32.82 ตามลำดับ<sup>[14]</sup>





รูปที่ 1.10 โครงสร้างสารประกอบ (1-16) จากรากชะพลูโดย Tuntiwachwuttikul และ คณะ (2006)

### ปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (Ozonolysis)

Dawid และ คณะ (2012) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของสารประกอบที่มีรสเผ็ดฉุนและรสเปรี้ยวซ่าจากพริกไทย (*Piper nigrum* L.) โดยนำพริกไทยสกัดด้วยเอทานอล พบว่าสามารถแยกสารประกอบเอไมด์ที่มีพันธะคู่บริเวณสายยาว (non-conjugated double bond) และทำปฏิกิริยาไอโซไนไลซิสในการหาตำแหน่งพันธะคู่บริเวณสายยาว โดยใช้เมทานอล (methanol) และเมทิลีนคลอไรด์ (methylene chloride) (1:1) 18 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย และให้สภาวะในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่อุณหภูมิ -78 องศาเซลเซียส หลังจากที่ทำปฏิกิริยาเสร็จจึงนำไปทดสอบด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี GC-MS เพื่อพิสูจน์โครงสร้าง<sup>[6]</sup>

#### 1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารประกอบแอลคิลเอไมด์ในผลของตีปาลี (*Piper retrofractrum*) และชะพลู (*Piper sarmentosum*)
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์หลังทำปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis)
3. เพื่อนำสารประกอบแอลคิลเอไมด์ที่ถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้โครงสร้างของสารประกอบแอลคิลเอไมด์ในผลของตีปาลี (*Piper retrofractrum*) และชะพลู (*Piper sarmentosum*)
2. จากการทำปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) จะทราบตำแหน่งพันธะคู่บริเวณสายยาวที่ระบุด้วยเทคนิค NMR ไม่ได้
3. ได้สารประกอบแอลคิลเอไมด์ที่ถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีเพื่อไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

## บทที่ 2

### การทดลองและผลการทดลอง

#### 2.1 พืชตัวอย่าง

ผลดีป्लीที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากร้านเจ้ากรมเปือ ถนนจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร และผลชะพลูที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากอุทยาน 100 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซอยจุฬาลงกรณ์ 5 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

#### 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. กระจกตวง (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. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
18. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
19. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer: NMR)
20. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)
21. เครื่องแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (flash chromatography) รุ่น Isolera

22. แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์/แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography-Mass Spectrometer/Mass Spectrometer: GC-MS/MS) รุ่น Agilent 7890GC/ 7000C GC/MS Triple Quad
23. UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้คือ 254 นาโนเมตร
24. เครื่องผลิตโอโซน (ozone generator)

### 2.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate) เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) แอซิโตน (acetone) คลอโรฟอร์มดี ( $\text{CDCl}_3$ ) และน้ำ milli Q
2. ซิลิกาเจล เบอร์ 7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography)
3. เซฟาเด็กซ์ (Sephadex LH-20)
4. ตัวทำปฏิกิริยา anisaldehyde
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)

### 2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. คั้นคว่ำสีบคั้นข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบแอลคิลเอไมด์ในผลของตีป्ली (Piper refractum) และชะพลู (Piper sarmentosum)
2. นำผลตีป्लीหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นสกัดด้วยเฮกเซนแล้วนำกากที่ได้มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ในส่วนของผลชะพลูหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นสกัดด้วยเมทานอล นำส่วนสกัดเมทานอลมาสกัดต่อด้วยเฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ
3. นำสารที่สกัดได้จากผลของตีป्लीและชะพลูไปแยกสารกลุ่มแอลคิลเอไมด์และทำให้บริสุทธิ์ (isolation and purification) โดยวิธีดังนี้ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography), เซฟาเด็กซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟี (sephadex LH-20 column chromatography), ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography) และ แฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (flash column chromatography) เป็นต้น
4. วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแอลคิลเอไมด์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว

5. นำสารกลุ่มแอลคิลเอไมด์ไปทำปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี (GC-MS) เพื่อหาตำแหน่งของพันธะคู่ (isolated carbon-carbon double bond) ที่แน่นอน
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

## 2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

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

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารอย่างง่ายและรวดเร็ว โดยใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร หรือใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของสารระหว่างวัฏภาคหนึ่งซึ่งเป็นการดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้ว หรือแผ่นพลาสติกแข็ง ซึ่งในการทดลองจะใช้วัฏภาคหนึ่งเป็นซิลิกาเจลที่เคลือบบนแผ่นอลูมินา (TLC aluminum sheets silica gel 60 F254) และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านตัวดูดซับ TLC จึงจัดเป็น solid-liquid adsorption chromatography

ก. การเตรียม TLC Chamber สำหรับการ develop แผ่น TLC เลือกใช้โถแก้วขนาดเหมาะสมกับแผ่น TLC ที่จะนำมา develop หลังจากนั้นใส่กระดาษกรองที่มีขนาดพอดีกับรูปร่างภาชนะ เติมตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้ระดับของตัวทำละลายสูงจากก้นภาชนะไม่เกินระดับที่ขีดไว้บนแผ่น TLC โดยให้เส้นที่ขีดไว้อยู่เหนือระดับตัวทำละลายเล็กน้อย ปิดฝาที่สะอาดให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมกระดาษกรองทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การใส่สารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC เริ่มจากนำแผ่น TLC ขีดเส้นกำหนดระดับด้านล่างตำแหน่งที่ต้องการแต้มสารตัวอย่างโดยให้ระดับเส้นที่ขีดสูงขึ้นมาประมาณ 0.9 เซนติเมตรของแผ่น TLC หลังจากนั้นใช้หลอดคาปิลลารีจุ่มลงในสารละลายตัวอย่าง แล้วแต้มสารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC ที่ขีดเส้นกำหนดไว้ โดยต้องทำให้จุดที่หยดสารละลายตัวอย่างมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2-3 มิลลิเมตร และแต่ละจุดต้องห่างกันประมาณ 0.4 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงนำไป develop ในขั้นตอนต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่ถูกแต้มด้วยสารละลายตัวอย่างเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก่ที่บรรจุตัวทำละลายที่ต้องการจะใช้ และมีการอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายในภาชนะ เมื่อหย่อนแผ่น TLC ลงไปต้องมั่นใจว่าตัวทำละลายไม่สูงเกินระดับเส้นที่ขีดไว้หรือตำแหน่งที่มีการแต้มสารละลายตัวอย่าง จากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วตั้งทิ้ง

ไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจากเดิมแผ่นหรือถึงระดับสูงสุดที่กำหนด แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะ ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยออกจากแผ่น TLC จนแห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยใช้วิธีการอ่านแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อนำแผ่น TLC ที่แห้งสนิทไปส่องแสง UV เพื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง แต่ในบางกรณีที่สารไม่สามารถดูดกลืนแสงได้จะต้องนำไปย้อมด้วยสารเคมีชนิดอื่น ซึ่งในการทดลองใช้ตัวทำปฏิกิริยา anisaldehyde หลังจากนั้นนำแผ่นที่ TLC ที่ย้อมแล้ววางบนเครื่องให้ความร้อน (hotplate) สารที่ไม่สามารถดูดกลืนแสงจะปรากฏสีออกมาทำให้สามารถวิเคราะห์สารละลายผสมตัวอย่างได้

### 2.5.2 ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกองค์ประกอบของสารในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยใช้ความแตกต่างของความมีขั้วของสาร เมื่อโมเลกุลของตัวถูกละลายในสารตัวอย่างผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะถูกพาออกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่จะเกิดการกระจายตัว (distribute) ระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ และตัวดูดซับหรือวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) โมเลกุลของสารตัวอย่างจะถูกดูดซับที่ผิวของวัฏภาคนิ่ง ซึ่งในการทดลองใช้ซิลิกาเจลที่มีความมีขั้วสูงจึงสามารถดูดซับกับโมเลกุลสารที่มีขั้วสูงด้วยแรงดึงดูดที่แข็งแรงกว่าโมเลกุลสารที่มีขั้วต่ำ และในขณะเดียวกันวัฏภาคเคลื่อนที่จะแข่งขันในการดึงโมเลกุลของสารเพื่อพาสารออกจากคอลัมน์ เพราะฉะนั้นสารต่างชนิดจะถูกดูดซับได้แตกต่างกันทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่พาสารออกจากคอลัมน์ไม่พร้อมกันนำไปสู่การแยกของสารและถ้าตัวดูดซับมีพื้นที่ผิวมากจะมีความสามารถในการดูดซับได้ดียิ่งกว่าพื้นที่ผิวในการดูดซับน้อย

ก. การเตรียมคอลัมน์ นำคอลัมน์ขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณของสารที่ต้องการแยก ใส่สารตัวตรงปลายคอลัมน์ป้องกันการรั่วไหลของตัวดูดซับหรือซิลิกาเจล นำคอลัมน์ติดตั้งไว้ที่ฐานยึดคอลัมน์โดยให้คอลัมน์ตั้งตรงหรือตั้งฉากกับพื้น หลังจากนั้นนำซิลิกาเจลใส่ลงในบีกเกอร์ปริมาณสามส่วนของคอลัมน์แล้วจึงใส่ตัวทำละลายที่ต้องการใช้ลงไปแล้วคนซิลิกาเจลให้กระจายในตัวทำละลาย (ส่วนผสมนี้เรียกว่า slurry) จากนั้นเท slurry ผ่านแท่งแก้วลงในคอลัมน์ เปิดก๊อกให้ตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ และใช้สายยางเคาะด้านข้างคอลัมน์เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดแน่นกันและป้องกันการเกิดฟองอากาศภายในคอลัมน์ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการแล้วจะต้องระวังให้ตัวทำละลายอยู่ระดับสูงกว่าผิวซิลิกาเจลเสมอเพื่อป้องกันการแห้งและแตกของเม็ดซิลิกา

ข. การเตรียมสารตัวอย่าง ในการทดลองจะใช้วิธีการโหลดสารแบบแห้ง โดยนำสารตัวอย่างผสมที่ต้องการจะแยกละลายด้วยตัวทำละลายระบบที่ใช้ในการเตรียมคอลัมน์เพียงเล็กน้อยหรือปริมาณน้อยที่สุดที่ทำให้สารตัวอย่างสามารถละลายได้

หลังจากนั้นนำซิลิกาเจลใส่ลงไปในสารแล้วคนจนกว่าตัวทำละลายจะระเหยออกหรือสารจะแห้งหายโดยสามารถนำไปจุ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยเร็วขึ้น เมื่อสารแห้งสนิทจนมีลักษณะเหมือนผงซิลิกาเจลจึงสามารถนำไปโหลดลงคอลัมน์

ค. การโหลดสารลงคอลัมน์ หลังจากเตรียมสารที่จะนำมาโหลดแล้วจะเปิดวาล์วคอลัมน์เพื่อให้ตัวทำละลายลดลงถึงระดับที่สูงกว่าผิวของตัวดูดซับประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดวาล์วคอลัมน์ นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในคอลัมน์แล้วเปิดให้ตัวทำละลายไหลจนสารตัวอย่างลงไปอยู่ระดับของเดียวกับตัวดูดซับ จึงค่อยชะสารที่ติดอยู่ข้างคอลัมน์หรือในภาชนะให้ไหลลงสู่ตัวดูดซับทีละน้อย เมื่อสีของตัวชะที่อยู่เหนือผิวซิลิกาเจลจางลงจนกระทั่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี จึงใส่ตัวทำละลายปริมาณมากลงไปในคอลัมน์ ซึ่งข้อควรระวังในการใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีคือไม่ควรทำให้ซิลิกาเจลแห้งเพราะจะเกิดการหดตัวจากผนังคอลัมน์ เกิดช่องว่างให้อากาศเข้าไปแทรกและเกิดการแตกแยกในชั้นซิลิกา ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดี

### 2.5.3 เซฟาเดกซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Sephadex LH-20 Column

#### Chromatography)

เป็นเทคนิคในการแยกองค์ประกอบของสารโดยใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (size exclusion chromatography) โดยวัฏภาคหนึ่งประกอบไปด้วยเจลจะถูกเชื่อมเข้าด้วยกันเป็นโครงข่ายสามมิติ อนุภาคเม็ดเล็กที่มีสมบัติพองตัวได้ทำให้เกิดรูพรุนคล้ายฟองน้ำ โดยสารโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูพรุนไม่สามารถผ่านเข้าไปภายในรูพรุนได้ จึงถูกตัวทำละลายชะออกมาตามช่องว่างระหว่างเม็ดเจลทำให้สารโมเลกุลใหญ่ออกจากคอลัมน์ก่อนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเนื่องจากสารโมเลกุลขนาดเล็กจะผ่านเข้าไปในรูพรุนของอนุภาคเจล โดยการเตรียมคอลัมน์สามารถทำเช่นเดียวกับเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography) ในขณะที่การโหลดสารจะใช้วิธีโหลดแบบเปียกหรือใส่สารละลายตัวอย่างลงไปในคอลัมน์เลย

### 2.5.4 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid

#### Chromatography: HPLC)

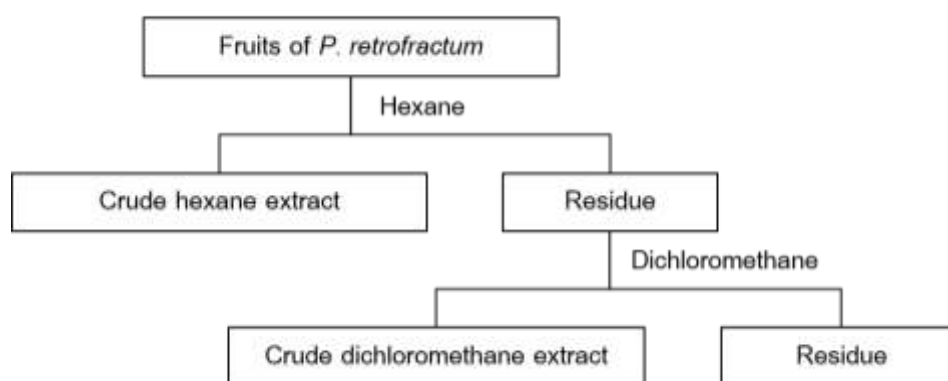
เป็นเทคนิคในการแยกองค์ประกอบของสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนวัฏภาคหนึ่ง (stationary phase) ภายใต้การพาของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสำหรับเทคนิคนี้ วัฏภาคหนึ่งถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่คือตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง HPLC สารดังกล่าวจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยมีแรงดันจากปั๊ม (pump) เป็นตัวช่วยในการทำงานของเครื่องทำให้ตัวทำ

ละลายสามารถไหลได้อย่างต่อเนื่อง สำหรับการแยกองค์ประกอบของสารจะเกิดในคอลัมน์เพื่อให้เกิดการแยกสาร (separation) จะอาศัยการมีอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างสารที่เข้ากันได้ดีกับวัฏภาคหนึ่ง และความสามารถในการละลายของสารผสม นอกจากนี้การแยกสารผสมยังมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างของสาร และสมบัติทางเคมีของสารที่อยู่ในคอลัมน์ เช่น วัฏภาคหนึ่งที่ใช้มีคุณสมบัติความมีขั้วต่ำ โมเลกุลสารที่มีขั้วต่ำก็จะมีอันตรกิริยาที่ดีกว่าโมเลกุลสารที่มีขั้วมาก ทำให้สารที่ขั้วต่ำดังกล่าวออกมาจากคอลัมน์ช้ากว่าสารที่มีขั้วสูง เป็นต้น หลังจากที่สารแต่ละชนิดถูกแยกเป็นส่วน ๆ จะเคลื่อนที่อยู่ภายในคอลัมน์ในเวลาต่างกัน และผ่านเข้าสู่อุปกรณ์วัดสัญญาณ (detector) และแปรผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (Chromatogram) ซึ่งแต่ละสารจะมีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention time, RT) เฉพาะตัว ในการวิเคราะห์สารผสมตัวอย่างสามารถนำสารที่รู้โครงสร้างทางเคมีหรือสารมาตรฐานฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วเปรียบเทียบระยะเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ระหว่างสารมาตรฐานและสารผสมตัวอย่าง เพื่อยืนยันว่าสารผสมตัวอย่างมีสารมาตรฐานผสมอยู่ ข้อควรระวังของเทคนิคนี้คือตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่ใช้จะต้องละลายสารตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์ได้ เพื่อป้องกันการตกตะกอนไม่ให้เกิดการอุดตันในระบบ ดังนั้นก่อนที่จะนำสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่องจำเป็นจะต้องกรองด้วย membrane filter ขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอนก่อนทุกครั้ง เพื่อนำส่วนที่ไม่ละลายหรือมีโมเลกุลขนาดใหญ่ออกจากสารที่จะนำไปวิเคราะห์

## 2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

### 2.6.1 การสกัดผลดีป्ली

นำ 4 กิโลกรัมของผลดีป्लीที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ มาสกัดด้วยเฮกเซนเป็นเวลา 2 วัน จำนวน 2 ครั้ง จะได้ส่วนของสิ่งสกัดเฮกเซน (crude hexane extract) และกากที่เหลือ (residue) หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 2 วัน จำนวน 2 ครั้ง จะได้ส่วนของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน (crude dichloromethane extract) ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1 นำส่วนนี้ไปแยกสารประกอบในหัวข้อ 2.7.1 ต่อไป

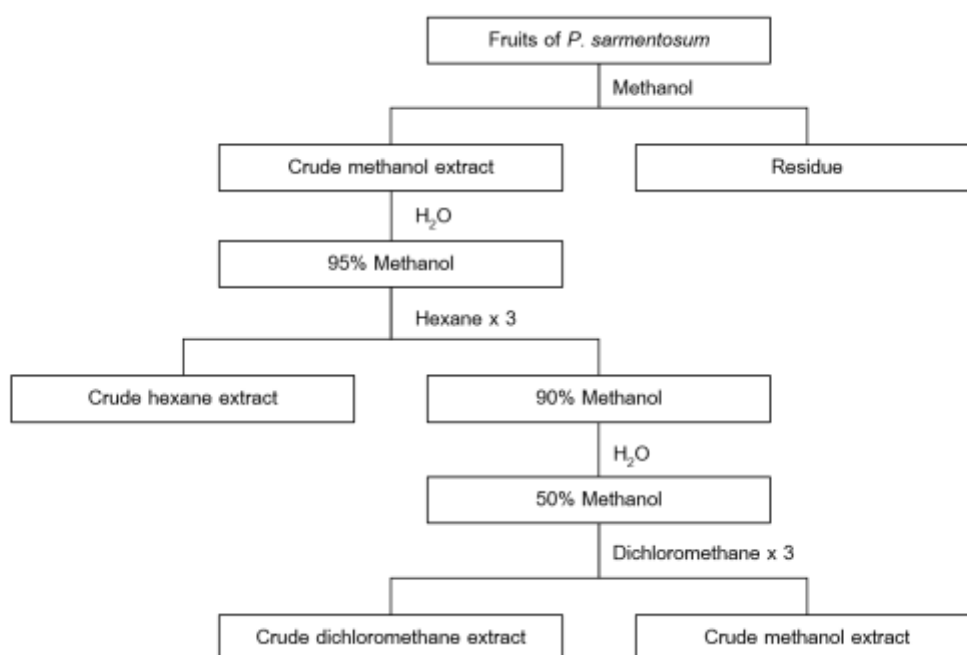




## แผนภาพที่ 2.1 การสกัดผลดีป्ली (*Piper retrofractum*)

### 2.6.3 การสกัดผลชะพลู

นำผลชะพลูที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ (854 กรัม) มาสกัดด้วยเมทานอล จะได้ส่วนของสิ่งสกัดจากเมทานอล (crude methanol extract) หลังจากนั้นนำมาสกัดซ้ำด้วยเฮกเซน 3 ครั้ง จะได้ส่วนของสิ่งสกัดเฮกเซน (crude hexane extract) และสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งเป็นส่วนที่จะนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนอีกจำนวน 3 ครั้ง จะได้ส่วนของสิ่งสกัดเมทานอล และสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน (crude dichloromethane extract) ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.2 โดยจะนำส่วนนี้ไปทำการแยกสารประกอบในหัวข้อ 2.7.2 ต่อไป



## แผนภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสกัดผลชะพลู (*Piper sarmentosum*)

### 2.7 การแยกสารประกอบ

#### 2.7.1 การแยกสารประกอบจากผลดีป्ली

- นำสิ่งสกัดจากผลดีป्लीที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัด 50 กรัม
- นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน 50 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel column chromatography) ด้วยระบบ 100% เฮกเซน แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซิเตต จนมีอัตราส่วน 100% เอทิลอะซิเตต หลังจากนั้นค่อยๆ เพิ่มขั้วครั้งสุดท้ายด้วยเมทานอลจนมีอัตราส่วน 100% เมทานอล นำสารละลายแต่

ละส่วนตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม พบว่าสามารถแยกสารออกมาได้ 10 แพรกชัน (1-10) ดังสรุปไว้ในแผนภาพที่ 2.3 และ แพรกชัน 3 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

3. นำ แพรกชัน 3 มาแยกด้วยเทคนิคเซฟาเด็กซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Sephadex LH-20 column chromatography) ด้วยระบบตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยสามารถแยกสารออกมาได้ 6 แพรกชัน (A-F) ในส่วนของ แพรกชัน D และ E น่าจะมีสารที่น่าสนใจ เพราะจากผล TLC พบว่า สารทั้ง 2 แพรกชันมีปริมาณมากและมีการลากหางคล้ายกัน จึงนำมาแยกต่อในข้อต่อไป

4. นำ แพรกชัน D และ E รวมกัน หลังจากนั้นแยกด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (flash column chromatography) แบบ reversed phase ด้วยระบบตัวทำละลาย 50% เมทานอล-น้ำ จนถึง 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 25 มิลลิลิตรต่อนาที โดยสามารถแยกสารออกมาได้ 3 แพรกชัน ( $D_{1.1}$ - $D_{1.3}$ ) เมื่อนำไปทดสอบด้วย TLC ที่ใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน-เอทิลอะซิเตต (3:1:1) พบว่า แพรกชัน  $D_{1.2}$  มีจุดสาร 2 จุดหลักที่แยกกันชัดเจนโดยที่ทั้ง 2 จุดมีปริมาณเท่าๆ กัน ในส่วนของ แพรกชัน  $D_{1.3}$  มีจุดสาร 2 จุดหลักแยกกันชัดเจน และจุดสารข้างบนมีปริมาณสารที่มากกว่าจุดสารข้างล่าง ทำให้ทั้ง 2 แพรกชันน่าจะมีสารที่น่าสนใจ

5. นำ แพรกชัน  $D_{1.2}$  มาแยกด้วยเทคนิคเซฟาเด็กซ์คอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลายคือ เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (1:1) สามารถแยกสารออกมาได้ 4 แพรกชัน ( $D_{2.1}$ - $D_{2.4}$ ) เมื่อนำไปทดสอบด้วย TLC ที่ใช้ระบบ 100% ไดคลอโรมีเทน พบว่า แพรกชัน  $D_{2.2}$ ,  $D_{2.3}$  และ  $D_{2.4}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำ แพรกชัน  $D_{2.4}$  มาแยกด้วยเทคนิค TLC ที่ใช้ระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน โดยเทียบกับสารบริสุทธิ์ methy piperate ที่เคยแยกได้ก่อนหน้านี้ พบว่า แพรกชัน  $D_{2.4}$  มีจุดสารหลายจุดที่แยกกันชัดเจน และมีจุดสารหลักตรงกับสารบริสุทธิ์ สามารถคาดเดาได้ว่าใน แพรกชัน  $D_{2.4}$  มีสารบริสุทธิ์นั้นเป็นองค์ประกอบ จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **FK1**

7. นำ แพรกชัน  $D_{2.2}$  มาแยกด้วยเทคนิค TLC ที่ใช้ระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน โดยเทียบกับสารที่รู้โครงสร้างชนิด alpha-beta unsaturated amide และเคยแยกได้ก่อนหน้านี้ พบว่า แพรกชัน  $D_{2.2}$  มีสารที่ต้องการ และจุดสารตรงกับสารที่รู้โครงสร้าง สามารถคาดเดาได้ว่า ใน แพรกชัน  $D_{2.2}$  มีโครงสร้างของสารชนิดนั้นเป็นองค์ประกอบ เพื่อเป็นการยืนยันจึงนำ แพรกชันนี้ไปแยกด้วยเทคนิคอื่น ๆ ต่อไป

8. นำ แพรกชัน  $D_{2.2}$  มาแยกด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เมทานอลด้วยอัตราการไหล (flow rate) 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีพีคปรากฏ 2

พีก ที่ retention time (RT) ดังนี้ 14.836 และ 18.467 นาที หลังจากนั้นทดสอบสารที่ เคยแยกได้ชนิด alpha-beta unsaturated amide และคาดว่ามิโครงสร้างทางเคมี เดียวกับแฟรกชันนี้ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพีกขึ้นที่ retention time ใกล้เคียงกันคือ 14.913 และ 18.530 นาที และจากผลของการดูดกลืนแสง UV ของเครื่องตรวจวัด สัญญาณ (detector) พบว่าสารแฟรกชัน D<sub>2.2</sub> สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตรเหมือนกับสารที่เคยแยกได้ จึงยืนยันได้ว่าแฟรกชันนี้เป็นสาร **FK2**

9. นำแฟรกชัน D<sub>2.3</sub> มาแยกด้วยเทคนิค TLC ที่ใช้ระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน โดยเทียบกับสารที่รู้โครงสร้างและเคยแยกได้ก่อนหน้าคือ pellitorine พบว่าแฟรกชัน D<sub>2.3</sub> มีจุดสาร 3 จุดแยกกันชัดเจน และมีจุดสารที่ตรงกับสารที่รู้ โครงสร้าง จึงสามารถคาดเดาได้ว่า แฟรกชัน D<sub>2.3</sub> มีสารประกอบโครงสร้างเหมือนกับ สาร pellitorine เพื่อเป็นการยืนยันจึงนำแฟรกชันนี้ไปทดสอบด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

10. นำแฟรกชัน D<sub>2.3</sub> มาแยกด้วยเทคนิค flash column chromatography แบบ reversed phase โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 75% เมทานอล-น้ำ ถึง 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 25 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถแยกสารได้ออกมา 4 แฟรกชัน (D<sub>3.1</sub>-D<sub>3.4</sub>) ซึ่งจากการทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน D<sub>3.2</sub> เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

11. นำแฟรกชัน D<sub>3.2</sub> มาแยกด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 2 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่ามีพีกขึ้น เพียงพีกเดียวที่ retention time คือ 9.242 นาที เมื่อนำสาร pellitorine ที่คาดว่าจะมี โครงสร้างเหมือนกับแฟรกชันนี้ ทดสอบด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพีกปรากฏขึ้นพีก เดียวที่ retention time ใกล้เคียงกันคือ 9.171 นาที จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้าง ของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี สรุปได้ว่าแฟรกชันนี้เป็นสาร **FK3**

12. นำแฟรกชัน D<sub>3.3</sub> มาแยกด้วยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน(อาร์กอนเกรด) แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วด้วย เมทานอล(อาร์กอนเกรด) จนมีอัตราส่วน 5% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน(อาร์กอน เกรด) สามารถแยกได้ 6 แฟรกชัน (D<sub>4.1</sub>-D<sub>4.6</sub>) นำไปทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน D<sub>4.5</sub> น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

13. นำแฟรกชัน D<sub>4.5</sub> มาแยกด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 95% เมทานอล-น้ำ ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าจากโครมาโต แกรมจะปรากฏพีก 5 พีก จึงสามารถแยกสารได้ 5 แฟรกชัน (D<sub>5.1</sub>-D<sub>5.5</sub>) ซึ่งแฟรกชัน D<sub>5.1</sub> และ D<sub>5.4</sub> เป็นแฟรกชันที่มีความสูงของพีกค่อนข้างสูง น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

14. นำแฟรกชัน D<sub>3.4</sub> มาแยกด้วยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน(อาร์กอนเกรด) แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วด้วยเม

ทานอล(อาร์กอนเกรด) จนมีอัตราส่วน 5% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน(อาร์กอนเกรด) สามารถแยกได้ 6 แฟรกชัน ( $D_{6.1}$ - $D_{6.6}$ ) พบว่าแฟรกชัน  $D_{6.4}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

15. นำแฟรกชัน  $D_{6.4}$  มาแยกด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 2 มิลลิลิตร พบว่ามีพีคปรากฏหลายพีค แต่มี 2 พีคที่มีความสูงของพีคค่อนข้างสูง และมี retention time ใกล้เคียงกับ สาร **FK2** จึงคาดว่าสารในแฟรกชัน  $D_{6.4}$  มีองค์ประกอบของสารที่มีโครงสร้างเหมือนสาร **FK2** ซึ่งจะต้องนำไปพิสูจน์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

16. นำแฟรกชัน  $D_{1.3}$  มาแยกด้วยเทคนิค Sephadex LH-20 column chromatography ด้วยระบบตัวทำละลาย เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (1:1) สามารถแยกสารได้ 3 แฟรกชัน ( $D_{7.1}$ - $D_{7.3}$ ) เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าแฟรกชัน  $D_{7.2}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

17. นำแฟรกชัน  $D_{7.2}$  มาแยกโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วด้วยอะซิโตนจนมีอัตราส่วน 100% อะซิโตน พบว่าสามารถแยกสารได้ 8 แฟรกชัน เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าแฟรกชัน  $D_{8.2}$  น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

18. นำแฟรกชัน  $D_{8.2}$  มาแยกด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 2 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า มีพีคปรากฏขึ้น 3 พีคโดยมี retention time ดังนี้ 12.349, 14.883 และ 18.523 พบว่า 2 พีคหลังมีความสูงของพีคค่อนข้างสูง เมื่อนำ retention time ของสาร **FK2** มาเทียบพบว่า พีคทั้ง 2 ค่อนข้างใกล้เคียงกัน จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **FK2**

19. นำแฟรกชัน 4+5 รวมกัน แล้วมาแยกด้วยเทคนิค Sephadex LH-20 column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (1:1) สามารถแยกได้ 6 แฟรกชัน (G-L) นำไปทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน I มีจุดสาร 2 จุดแยกกันชัดเจน ในขณะที่แฟรกชัน J มีจุดสารที่มีการลากหาง ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน คาดว่าน่าจะมีสารในปริมาณมาก จึงนำทั้ง 2 แฟรกชันทำการแยกต่อไป ดังสรุปไว้ในแผนภาพที่ 2.4

20. นำแฟรกชัน I มาแยกด้วยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซิเตตจนมีอัตราส่วน 100% เอทิลอะซิเตต สามารถแยกสารได้ 13 แฟรกชัน ( $I_{1.1}$ - $I_{1.13}$ ) นำไปทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน  $I_{1.4}$  เป็นสารบริสุทธิ์ จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้เป็นสาร **FK4**

21. นำแฟรกชัน  $I_{1.3}$  มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 2 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่ามีพีคหลัก

ปรากฏขึ้น 2 พีค ที่ retention time ดังนี้ 16.038 และ 20.120 นาที ซึ่งเมื่อเทียบกับ retention time ของสาร 2 คือ 9.614, 16.059 และ 20.079 นาที จึงคาดว่าแฟรกชัน I<sub>1,3</sub> มีองค์ประกอบของสาร **FK2** จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ยืนยันได้ว่าเป็นสาร **FK2**

22. จากการนำแฟรกชัน I<sub>1,5</sub>-I<sub>1,7</sub> ไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี พบว่ามีโครงสร้างเหมือนกับสารที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จาก H<sup>1</sup> NMR ไปเทียบกับข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้า สามารถคาดเดาได้ว่า ในแฟรกชันนี้เป็นสารผสมที่มีองค์ประกอบสาร **FK5** ปนอยู่จากนั้นจะนำไปแยกด้วยเทคนิคต่าง ๆ เพื่อให้สารมีความบริสุทธิ์

23. นำแฟรกชัน J มาแยกด้วยเทคนิค Sephadex LH-20 column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (1:1) สามารถแยกสารได้ 5 แฟรกชัน (J<sub>1,1</sub>-J<sub>1,5</sub>) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน J<sub>1,2</sub> เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ยืนยันได้ว่าเป็นสาร **FK4**

24. จากผล TLC แฟรกชัน J<sub>1,1</sub> มีจุดสาร 3 จุดที่แยกกันชัดเจน ในขณะที่แฟรกชัน J<sub>1,3</sub> มีจุดสารขนาดใหญ่ลากหาง ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี สามารถยืนยันได้ว่า ทั้ง 2 แฟรกชันเป็นสารผสมที่มีองค์ประกอบสาร **FK4** ปนอยู่

25. จากแฟรกชัน K, L และ J<sub>1,5</sub> นำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี สามารถยืนยันได้ว่าทั้งสามแฟรกชันเป็นสาร **FK6**

## 2.7.2 การแยกสารประกอบจากผลชะพลู

1. นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน (Crude dichloromethane extract) มาแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel column chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เฮกเซน แล้วค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นด้วยเอทิลอะซิเตตจนมีอัตราส่วน 100% เอทิลอะซิเตต หลังจากนั้นค่อยๆ เพิ่มขั้วด้วยเมทานอลจนมีอัตราส่วน 100% เมทานอล สามารถแยกสารได้ 13 แฟรกชัน (1-13) ดังสรุปไว้ในแผนภาพที่ 2.5

2. นำแฟรกชัน 8 และ 9 มาแยกด้วยเทคนิคเซฟาเด็กซ์คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Sephadex LH-20 column chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% เมทานอล สามารถแยกสารได้ 7 แฟรกชัน (A-G) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น เอทิลอะซิเตต-ไดคลอโรมีเทน (1:1) พบว่า แฟรกชัน B มีจุดสารเพียงจุดเดียว ในขณะที่แฟรกชัน C มีจุดสาร 3-4 จุดที่แยกได้อย่างชัดเจน จึงคาดเดาได้ว่ามีสารที่น่าสนใจอยู่ใน 2 แฟรกชันนี้

3. นำแฟรกชัน C ไปแยกด้วยเทคนิค Sephadex LH-20 column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (1:1) สามารถแยกสารออกมาได้ 5 แฟรกชัน (C<sub>1.1</sub>-C<sub>1.5</sub>) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน C<sub>1.2</sub> มีจุดสารเป็นวงกลมขนาดใหญ่จุดเดียวจึงจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป ในขณะที่เดียวกันแฟรกชัน C<sub>1.4</sub> มีจุดสารที่น่าสนใจ

4. แฟรกชัน C<sub>1.2</sub> เมื่อวางทิ้งไว้มีการตกผลึกเป็นของแข็งสีขาว จึงนำแฟรกชันนี้ตกผลึก (crystallize) ได้สารออกมา 2 แฟรกชัน (C<sub>2.1</sub> และ C<sub>2.2</sub>) จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปีพบว่า แฟรกชัน C<sub>2.1</sub> เป็นของผสม ในขณะที่ C<sub>2.2</sub> เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างเป็น สาร **FK7**

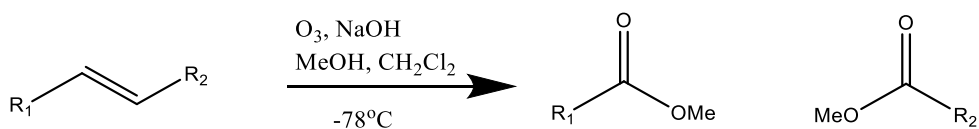
5. นำแฟรกชัน C<sub>1.4</sub> มาแยกด้วยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% เอทิลอะซิเตต-ไดคลอโรมีเทน แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วจนมีอัตราส่วนของตัวทำละลายเป็น 100% เอทิลอะซิเตต สามารถแยกสารออกมาได้ 17 แฟรกชัน (C<sub>6.1</sub>-C<sub>6.17</sub>) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่า แฟรกชัน C<sub>6.6</sub>-C<sub>6.8</sub> มีจุดสารที่คล้ายกันและน่าจะมีสารที่น่าสนใจอยู่ จึงนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคอื่น

6. นำแฟรกชัน C<sub>6.6</sub>-C<sub>6.8</sub> มาแยกด้วยเทคนิค แฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (flash column chromatography) แบบ reversed phase โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% เมทานอล-น้ำ ถึง 100% เมทานอล ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 15 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถแยกสารออกได้ 3 แฟรกชัน (C<sub>7.1</sub>-C<sub>7.3</sub>) จึงนำไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปีพบว่า แฟรกชัน C<sub>7.1</sub> น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

## 2.8 การทำปฏิกิริยาแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis)

ปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยมีโอโซนเป็นตัวออกซิไดส์ โดยจะทำให้พันธะคู่ในอัลคีนสลายลงหรือไปแตกพันธะคู่ออกเป็นสองส่วน และได้อัลดีไฮด์หรือคีโตนเป็นผลผลิต ขึ้นอยู่กับตัวทำปฏิกิริยา (reagent) ที่ใช้ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นประโยชน์ต่อการใช้ศึกษาโครงสร้างของอัลคีน และระบุตำแหน่งพันธะคู่ในโมเลกุลของอัลคีนได้

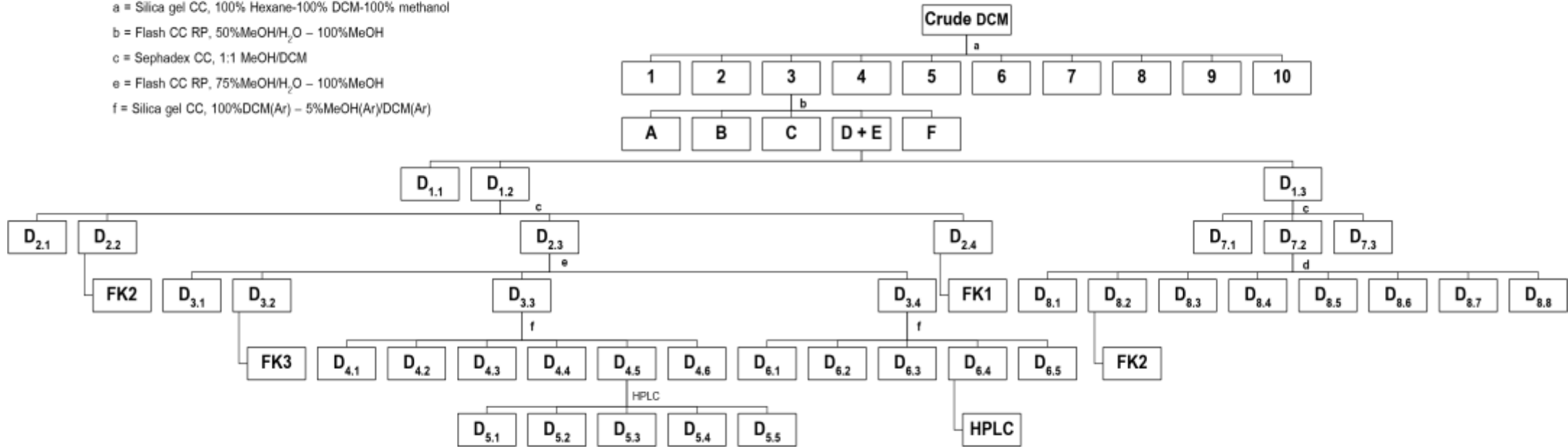
Marshall และ Garofalo (1993) ได้ทำการวิจัยการออกซิไดส์พันธะซิกมาของโมโน ไตรซับโอเลฟินส์เป็นสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ผ่านปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) ด้วยเมทานอลอนิกโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOMe) โดยนำสารประกอบอัลคีนมาตัดพันธะด้วยโอโซน ใส่เมทานอลิกโซเดียมไฮดรอกไซด์ และไดคลอโรมีเทนเป็นสารละลายภายใต้อุณหภูมิ -78°C นำไปสู่สารประกอบเมทิลเอสเทอร์<sup>[15]</sup> โดยมีกระบวนการดังรูปที่ 2.1



## รูปที่ 2.1 ปฏิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) ของสารประกอบอัลคีน

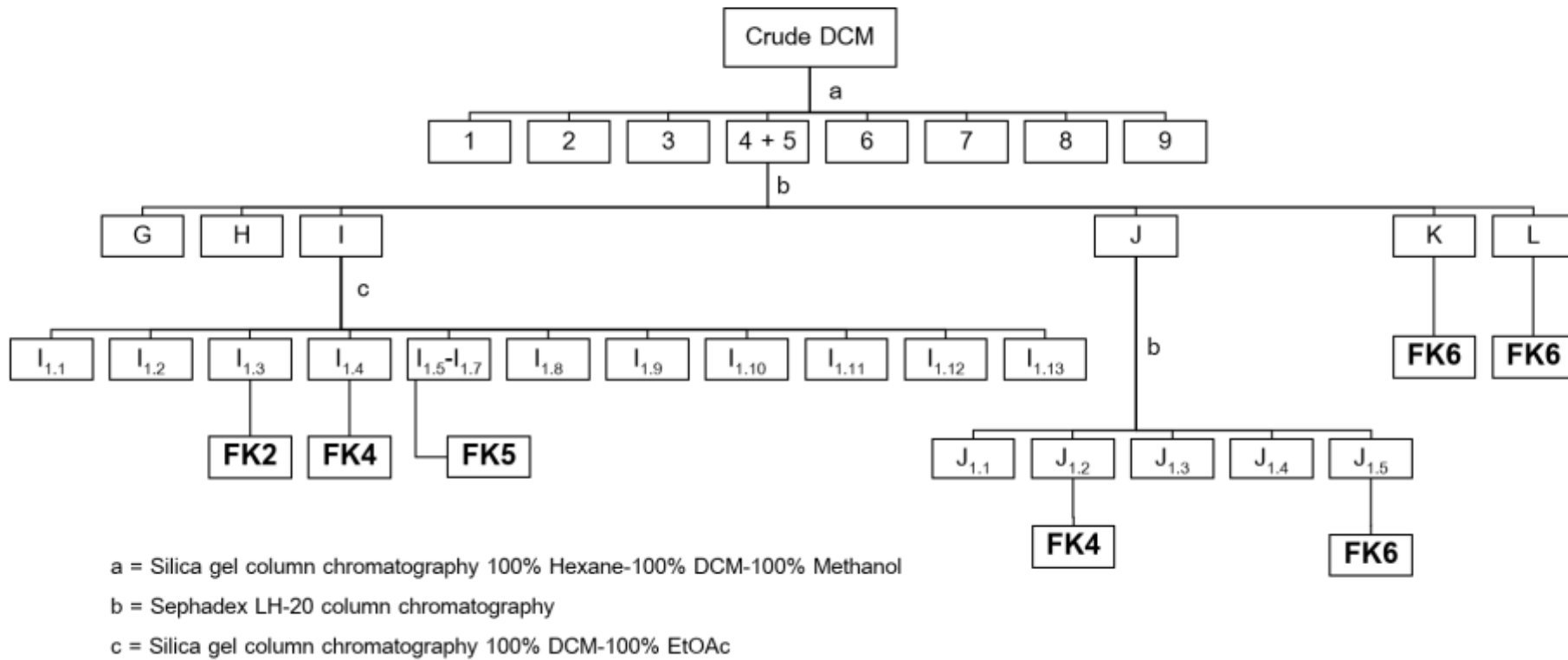
ในการทดลองนี้ได้นำแฟรกชัน  $C_{8,2}$  มาทำปฏิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน โดยนำมา 11 มิลลิกรัม ใส่ 2.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล (methanolic NaOH) กับตัวทำละลาย ซึ่งในการทดลองนี้คือ ไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นนำสารเตรียมไปแช่ในบีกเกอร์ที่ใส่น้ำแข็ง แล้วเริ่มการแยกสลายด้วยโอโซน โดยการเติมโอโซนลงไปในสารด้วยเครื่องผลิตโอโซน (ozone generator) แต่ก่อนขั้นตอนนี้ต้องเช็คก่อนว่าเครื่องผลิตโอโซนเรียบร้อยแล้ว เพราะถ้าไม่ใช่โอโซนที่ลงไปในสารอาจจะเกิด side effect ได้ หลังจากนั้นรอเป็นเวลา 10 นาที นำสารออกมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC ระบบตัวทำละลาย 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน โดยเทียบกับสารตั้งต้นหรือ แฟรกชัน  $C_{8,2}$  พบว่าเวลาในการทำปฏิริยา 10 นาที สารตั้งต้นยังมีอยู่ จึงนำไปใส่โอโซนต่ออีก 10 นาทีแล้วนำมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC อีกครั้ง พบว่าเวลาในการทำปฏิริยา 20 นาที ทำให้สารตั้งต้นหมดจึงหยุดการทำปฏิริยาการแยกสลายโอโซน นำสารผลิตภัณฑ์ไปสกัดด้วย เอทิลอะซิเตต-น้ำ เป็นจำนวน 3 รอบ นำสารที่เก็บได้ไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโทรสโกปี พบว่าผลิตภัณฑ์สารที่มีหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ ซึ่งยืนยันได้ว่าสารประกอบอัลคีนถูกแตกพันธะเป็นสารประกอบเอสเทอร์อย่างสมบูรณ์

- a = Silica gel CC, 100% Hexane-100% DCM-100% methanol
- b = Flash CC RP, 50%MeOH/H<sub>2</sub>O – 100%MeOH
- c = Sephadex CC, 1:1 MeOH/DCM
- e = Flash CC RP, 75%MeOH/H<sub>2</sub>O – 100%MeOH
- f = Silica gel CC, 100%DCM(Ar) – 5%MeOH(Ar)/DCM(Ar)

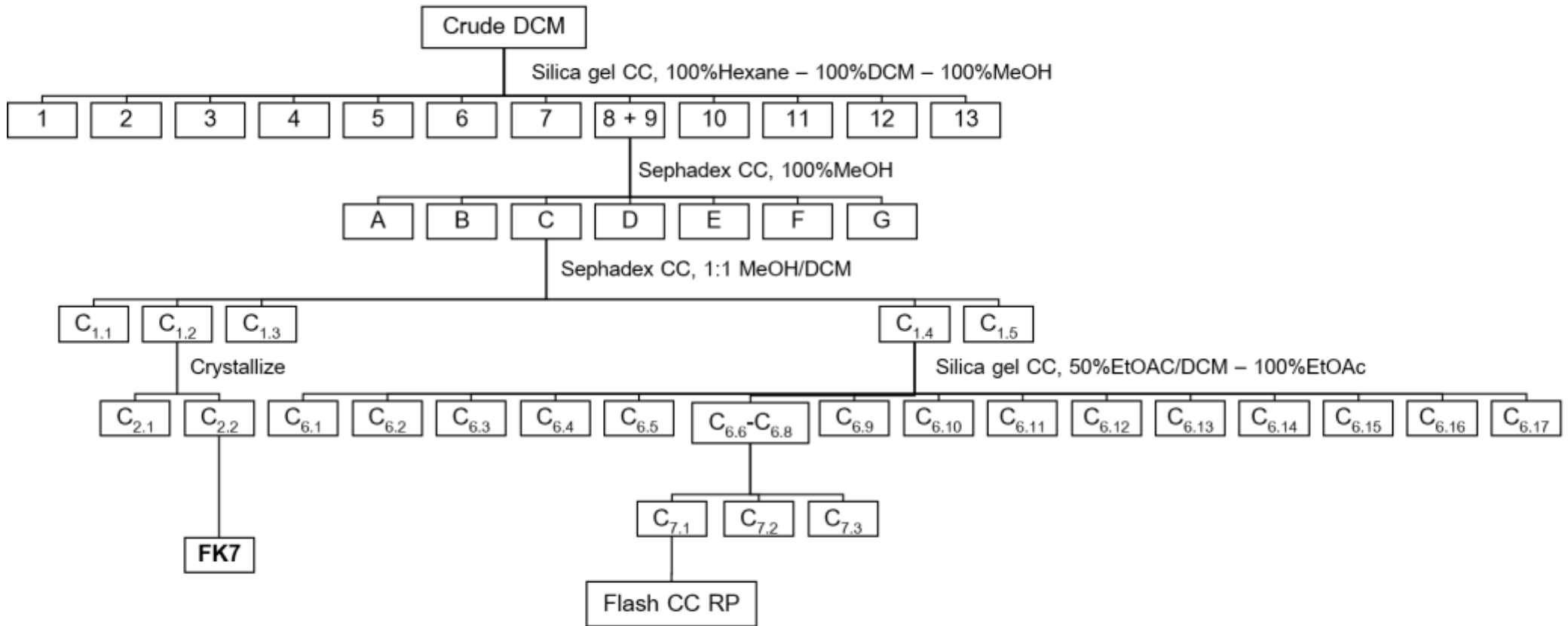


แผนภาพที่ 2.3 การแยกสารประกอบของผลดีป्ली





แผนภาพที่ 2.4 การแยกสารประกอบของผลดีปัส



แผนภาพที่ 2.5 การแยกสารประกอบของผลชะพลู

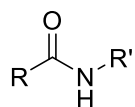
### บทที่ 3

#### การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

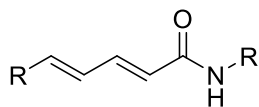
จากการทดลองการสกัดผลดีป्ली (*Piper retrofractum* Vahl.) เลือกใช้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน (crude dichloromethane extract) มาแยกองค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากสารกลุ่มแอลคิลเอไมด์ที่นักวิจัยสนใจศึกษา ส่วนใหญ่อยู่ในสิ่งสกัดเฮกเซน (crude hexane extract) จึงต้องการแยกสารแอลคิลเอไมด์ที่แตกต่างจากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน เพื่อให้ได้สารประกอบที่ยังไม่มีการพิสูจน์ทราบโครงสร้าง นอกจากนี้องค์ประกอบหลักของดีป्लीคือ piperine ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน นักวิจัยจึงคาดว่าสามารถแยกสารแอลคิลเอไมด์จากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนได้ ในส่วนของการสกัดผลชะพลู (*Piper sarmentosum*) เลือกใช้การสกัดด้วยเมทานอล เนื่องจากสารแอลคิลเอไมด์ที่แยกมาจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ในทางกลับกันสารที่แยกจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นส่วนที่ขั้วค่อนข้างสูง นักวิจัยจึงเลือกสกัดผลชะพลูด้วยเมทานอลเนื่องจากมีขั้วสูง และมีสารกลุ่มอื่นๆ ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

จากการทดลองแยกองค์ประกอบจากผลดีป्ली (*Piper retrofractum* Vahl.) และชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) พบว่าสามารถแยกสารประกอบจากผลดีป्लीได้ 6 ชนิด และสารประกอบจากผลชะพลูได้ 1 ชนิด จากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน สำหรับการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารใช้วิธีทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับสารประกอบที่เคยมีการรายงานก่อนหน้า

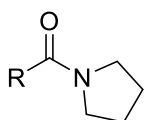
ซึ่งสารประกอบที่แยกได้จากผลดีป्ली มีโครงสร้างเป็นแอลคิลเอไมด์ (alkylamide) ที่มี conjugated diene หรือ alpha-beta unsaturated amide และมี isobutyl เป็น N-alkyl group จำนวน 4 สาร (FK2-FK5) ในขณะที่นอกนั้นเป็น ester group (FK1) และ carboxylic group (FK6) ในส่วนของสารประกอบของผลชะพลูโครงสร้างมี N-alkyl group เป็น pyrrolidine (FK7) (รูปที่ 3.1)



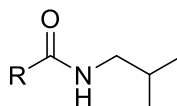
alkylamide



conjugated diene



pyrrolidine



isobutyl

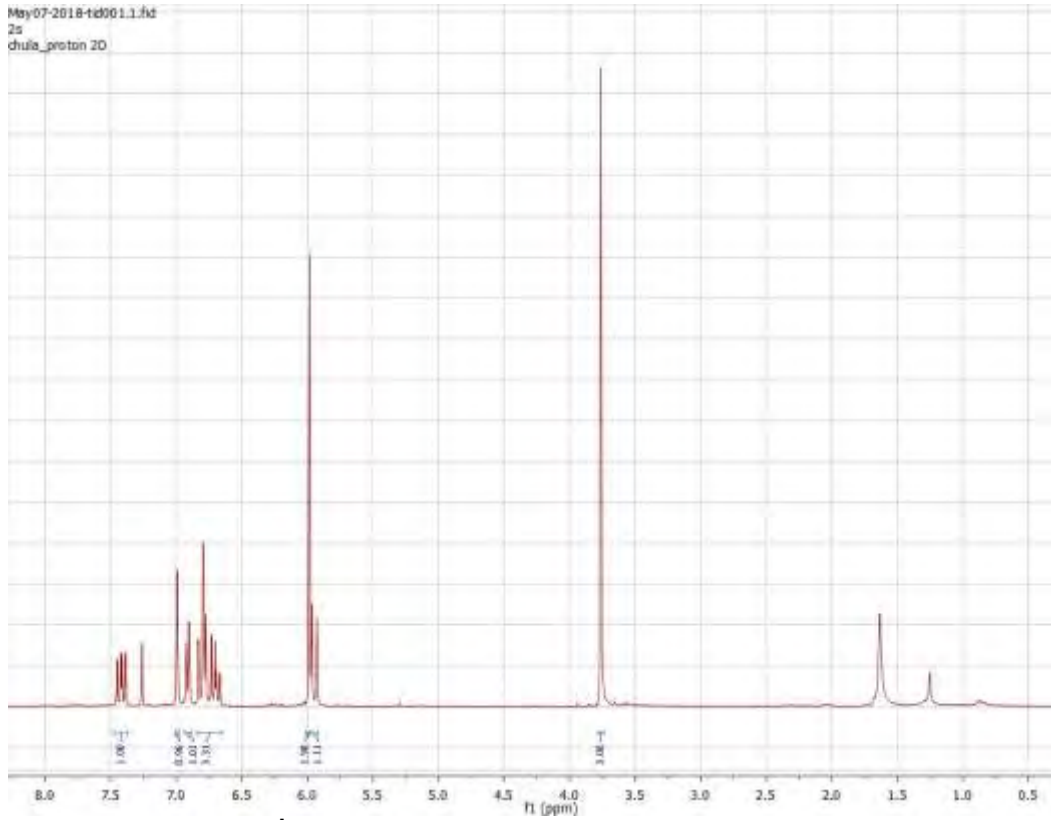
รูปที่ 3.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของสารประกอบที่แยกได้จากผลดีป्लीและชะพลู

### 3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK1

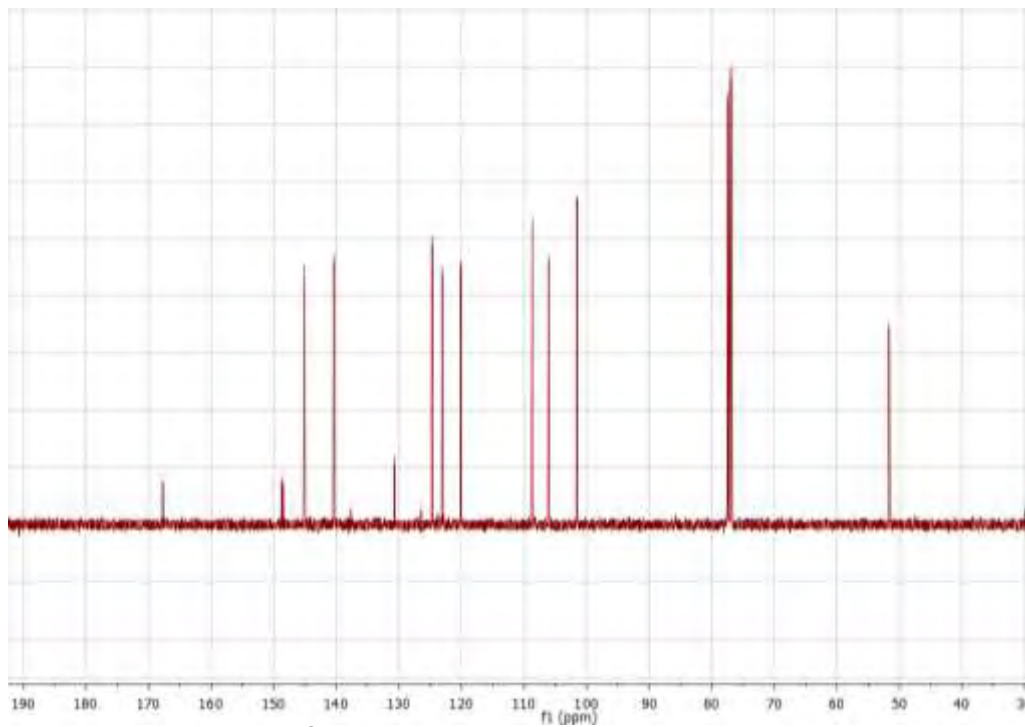
**FK1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.2 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.95 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, H-2), 6.70 (dd,  $J = 10.8, 15.2$  Hz, 1H, H-4), 6.81 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, H-5), 7.42 (dd,  $J = 10.8, 15.2$  Hz, 1H, H-3) สัญญาณโปรตอนในวงอะโรมาติก  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-10), 6.91 (dd,  $J = 1.6, 7.9$  Hz, 1H, H-11), 6.99 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-7) สัญญาณโปรตอนที่ตำแหน่ง dioxymethylene  $\delta_{\text{H}}$  5.93 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O) และสัญญาณโปรตอนของ methoxy  $\delta_{\text{H}}$  3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

จาก  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบข้อมูล chemical shift (รูปที่ 3.3) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  51.6 (OCH<sub>3</sub>), 101.5 (O-CH<sub>2</sub>-O), 106.1 (C-7), 108.1 (C-10), 120.1 (C-2), 123.1 (C-11), 124.7 (C-4), 130.1 (C-6), 140.4 (C-5), 145.1 (C-3), 148.7 (C-8) และ 167.7 (C-1)

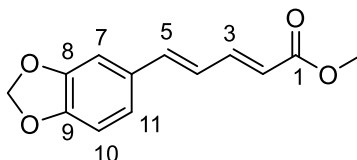
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  ของสาร **FK1** กับสาร methyl piperate พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **FK1** คือ methyl piperate ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.4 ที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ จากรายงานของ Lee และ คณะ (2008) โดยสารประกอบนี้แยกจากผลดีป्ली (*Piper longum*) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase ที่สามารถรักษาโรคอารมณ์เศร้าได้<sup>[16]</sup>



รูปที่ 3.2  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสารประกอบ FK1



รูปที่ 3.3  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร FK1



รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร FK1

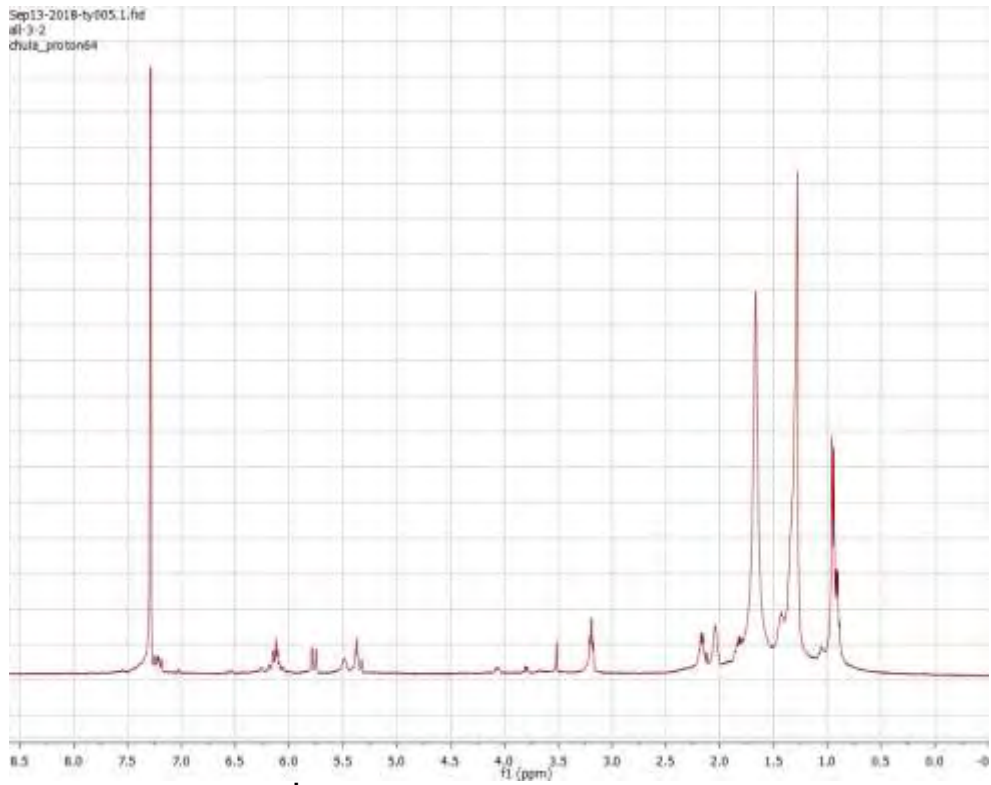
### 3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK2

**FK2** เป็นของหนืดไม่มีสี จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.5 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.74 (1H, *d*,  $J = 15.7$  Hz, H-2), 6.11 (*m*, 1H, H-5), 6.22 (*m*, 1H, H-4) และ 7.19 (1H, *dd*,  $J = 9.9, 15.7$  Hz, H-3) สัญญาณของโปรตอนของหมู่ methylene ที่ตำแหน่งallylic ที่  $\delta_{\text{H}}$  2.02 (*m*, 2H, H-11), 2.14 (*m*, 2H, H-6) และ 2.02 (*m*, 2H, H-14) สัญญาณโปรตอนของ *trans*-non conjugated double bond ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.34 (*m*, 2H, H-12, H-13) สัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl ปลายโซ่ที่  $\delta_{\text{H}}$  0.88 (*m*, 3H, H-20) โปรตอนของหมู่ isobutylamide ที่  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (*d*,  $J = 6.8$ , 3H, H-3'), 0.92 (*d*,  $J = 6.8$ , 3H, H-4'), 1.80 (*m*, 1H, H-2') และ 3.15 (*t*,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-1')

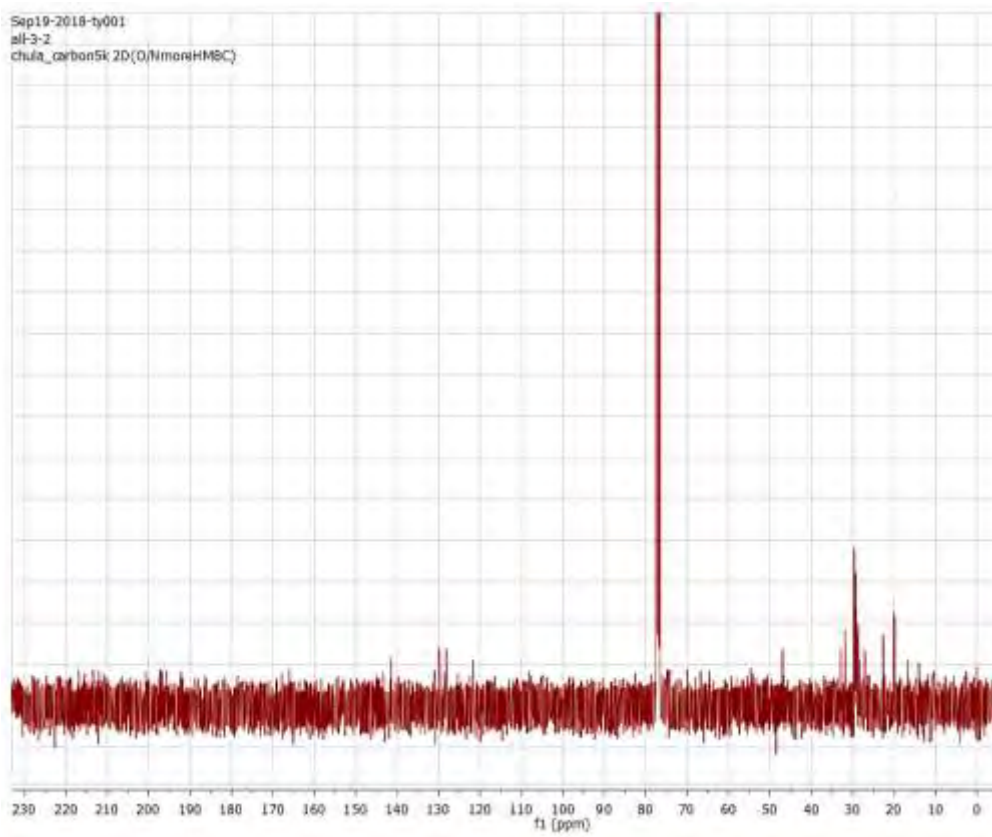
จาก  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบข้อมูล chemical shift (รูปที่ 3.6) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  14.3 (C-20), 20.0 (C-4'), 20.3 (C-3'), 22.8 (C-19), 27.4 (C-14), 32.1 (C-6), 47.1 (C-1'), 128.0 (C-2), 128.0 (C-4), 128.7 (C-12), 128.7 (C-13), 142.0 (C-5), 146.3 (C-3) และ 166.5 (C-1)

จากการเปรียบเทียบ  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมและข้อมูลแมสสเปกตรัมที่พบไอออนพีคที่ ( $m/z$ ) 362.3341  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (cal.  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  362.3423) ของสาร **FK2** กับสาร *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*,14*Z*-eicosatrienamamide ( $m/z$   $[\text{M}]^+$ 361.3341)<sup>[17]</sup> พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสามารถคาดเดาได้ว่าสารนี้มีโครงสร้างเป็น conjugated diene ที่มี non-conjugated double bond 1 ตำแหน่ง นำสาร **FK2** ไปทำปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยโอโซน (ozonolysis) ในสภาวะที่มี NaOH/MeOH เพื่อหาตำแหน่งที่แท้จริง non-conjugated double bond แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบสัญญาณของ methyl ester (octanoic acid) และ diester (octanedioic acid) ตามลำดับจึงสรุปได้ว่า non-conjugated double bond อยู่ที่ตำแหน่ง C-12 และ C-13 สาร **FK2** เป็นสารใหม่มีโครงสร้างดังรูปที่

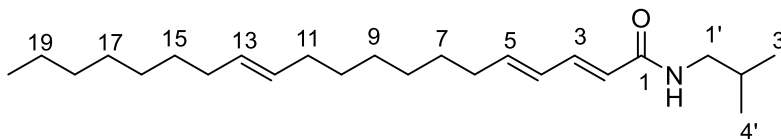
### 3.7



รูปที่ 3.5  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร FK2



รูปที่ 3.6  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร FK2



รูปที่ 3.7 โครงสร้างเคมีของสาร **FK2**

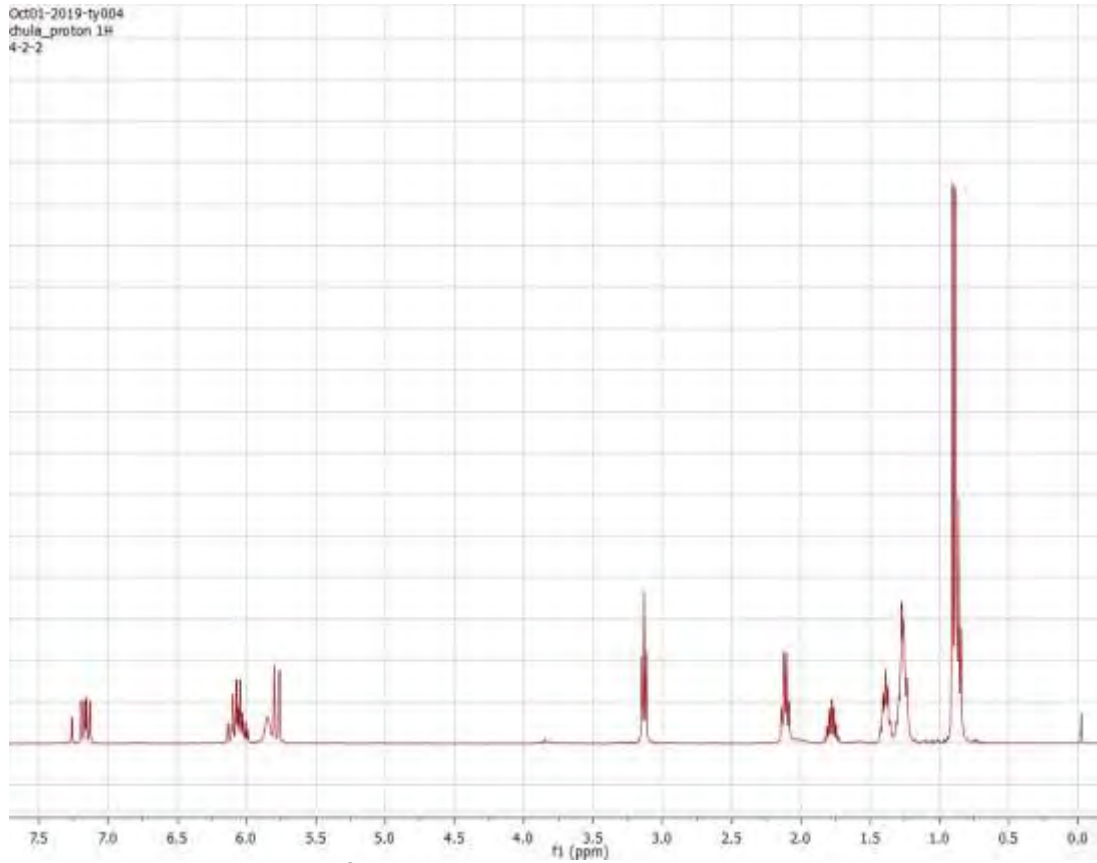
### 3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **FK3**

**FK3** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.8 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.78 (*d*,  $J = 15.0$  Hz, 1H, H-2), 6.02 (*m*, 1H, H-5), 6.09 (*dd*,  $J = 10.4, 15.0$  Hz, 1H, H-4) และ 7.16 (*dd*,  $J = 10.4, 15.0$ , 1H, H-3) สัญญาณโปรตอนของหมู่ methylene ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.38 (*m*, 2H, H-7), 1.27 (*m*, 2H, H-8), 1.27 (*m*, 2H, H-9) และ 2.11 (*q*,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-6) สัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl ปลายสายโซ่ที่  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (*t*,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-10) สัญญาณโปรตอนของหมู่ isobutylamide ที่  $\delta_{\text{H}}$  0.88 (*d*,  $J = 6.4$ , 3H, H-3'), 0.88 (*d*,  $J = 6.4$ , 3H, H-4'), 1.77 (*m*, 2H, H-2'), 3.13 (*t*,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-1') และ 5.85 (*brs*, 1H, N-H)

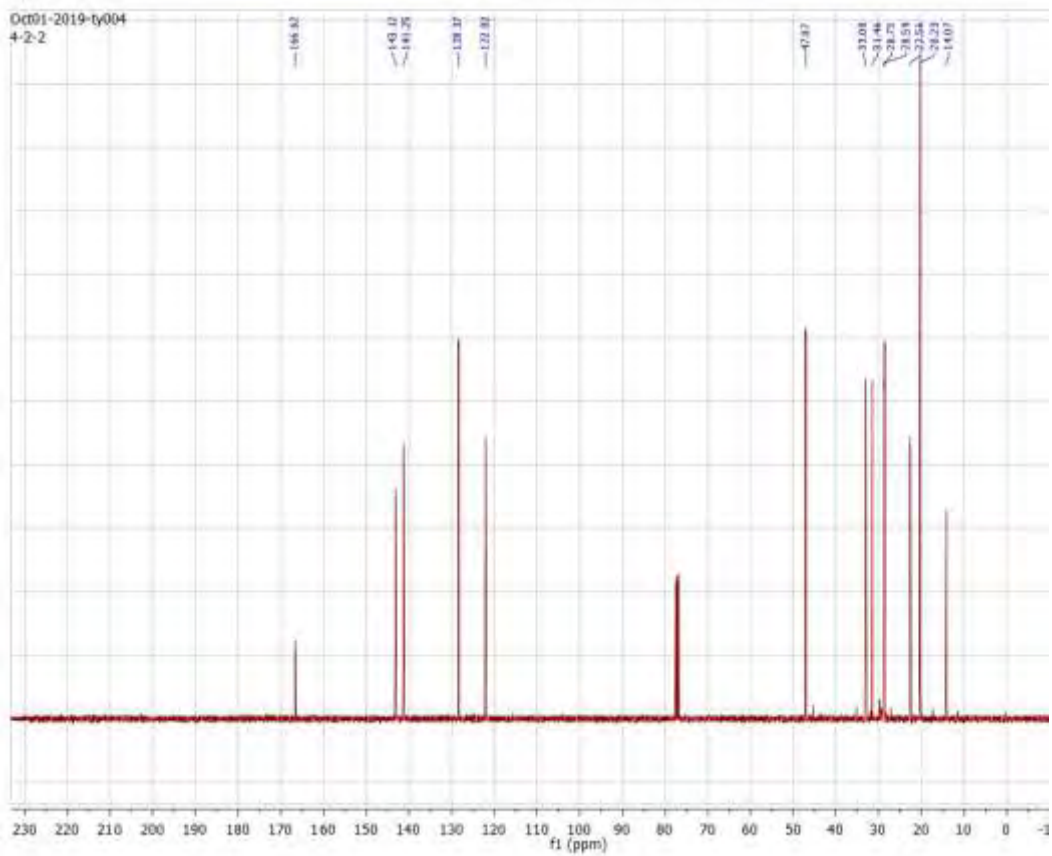
จาก  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบสัญญาณคาร์บอน (รูปที่ 3.9) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  14.3 (C-20), 20.0 (C-4'), 20.3 (C-3'), 22.8 (C-19), 27.4 (C-14), 32.1 (C-6), 47.1 (C-1'), 128.0 (C-2), 128.0 (C-4), 128.7 (C-12), 128.7 (C-13), 142.0 (C-5), 146.3 (C-3) และ 166.5 (C-1)

จากข้อมูลแมสสเปกตรัมที่พบไอออนพีคที่ ( $m/z$ ) 224.1999  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (cal.  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  224.2014) ของสาร **FK2** กับสาร pellitorine ( $m/z$   $[\text{M}]^+$  223)<sup>[18]</sup> เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  ของ สาร **FK3** กับสาร pellitorine ที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **FK3** คือ pellitorine ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.10 จากรายงานของ Park และ คณะ (2002) โดยสามารถแยกสารประกอบนี้จากผลพริกไทย (*Piper nigrum*) และมีฤทธิ์ในการป้องกันยุงสามสายพันธุ์ (*Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* และ *A. togoi*)<sup>[19]</sup>

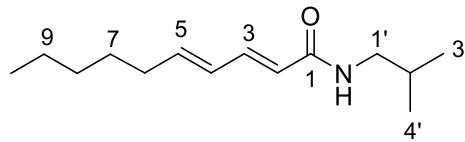




รูปที่ 3.8  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร FK3



รูปที่ 3.9  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร FK3



รูปที่ 3.10 โครงสร้างเคมีของสาร FK3

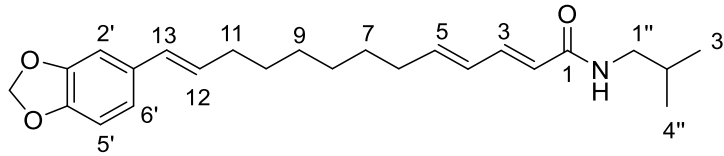
### 3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK4

**FK4** มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี จากข้อมูลสเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.11 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.78 (*d*,  $J = 15$  Hz, 1H, H-2), 6.09 (*m*, 1H, H-4), 6.09 (*m*, 1H, H-5), และ 7.21 (*dd*,  $J = 10.8, 15.2$  Hz, 1H, H-2) สัญญาณโปรตอนของ methylene ที่ตำแหน่ง allylic ที่  $\delta_{\text{H}}$  2.20 (4H, *m*, H-6, H-11) สัญญาณโปรตอนของหมู่ methylene ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.44 (*m*, 8H, H-7-H-10) สัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.09 (*m*, 1H, H-12) และ 6.31 (*d*,  $J = 15.0$  Hz, 1H, H-13) สัญญาณโปรตอนในวงอะโรมาติก ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.77 (*m*, 1H, H-5', H-6') และ 6.91 (*brs*, 1H, H-2') สัญญาณโปรตอนของ dioxymethylene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.95 (*s*, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O) สัญญาณโปรตอนของหมู่ isobutylamide ที่  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (*d*,  $J = 6.68$ , 3H, H-3' และ H-4'), 1.82 (*m*, 1H, H-2''), 3.19 (*t*,  $J = 6.36$  Hz, 2H, H-1'') และ 5.75 (*brs*, 1H, N-H)

จาก  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบสัญญาณคาร์บอน (รูปที่ 3.12) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  20.11 (C-3''), 20.11 (C-4''), 28.8 (C-2''), 28.9-29.8 (C-7-10), 32.8 (C-11), 32.9 (C-6), 47.2 (C-1''), 101.0 (O-CH<sub>2</sub>-O), 105.5 (C-2'), 108.2 (C-5'), 120.0 (C-2), 121.9 (C-6'), 128.4 (C-4), 129.5 (C-12), 129.5 (C-13), 132.6 (C-1'), 141.3 (C-5), 143.0 (C-3), 146.4 (C-4'), 148.0 (C-3') และ 166.6 (C-1)

จากข้อมูลแมสสเปกตรัมที่พบไอออนพีคที่ ( $m/z$ ) 406.2358  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (cal.  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  406.2358) ของสาร **FK2** กับสาร guineensine ( $m/z$   $[\text{M}]^+$  383)<sup>[18]</sup> เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  ของสาร **FK4** กับสาร guineensine พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **FK4** คือ guineensine ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.13 ซึ่งเคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ จากรายงานของ Narui และ คณะ (1995) โดยสามารถแยกสารประกอบนี้จากพริกไทยของโอกินาว่า<sup>[20]</sup>





รูปที่ 3.13 โครงสร้างเคมีของสาร FK4

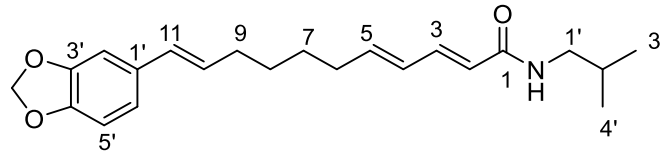
### 3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK5

**FK5** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากข้อมูล  $^1\text{H NMR}$  สเปกตรัม (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.14 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-conjugated diene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.75 (*d*,  $J = 15.0$  Hz, 1H, H-2), 6.06 (*m*, 1H, H-5), 6.11 (*m*, 1H, H-4), 7.18 (*dd*,  $J = 10.8, 15.2$  Hz, 1H, H-2) สัญญาณโปรตอนของหมู่ methylene ที่ตำแหน่ง allylic ที่  $\delta_{\text{H}}$  2.20 (*m*, 4H, H-6 และ H-9) สัญญาณโปรตอนของหมู่ methylene ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.46 (*m*, 4H, H-7-H-8) สัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.03 (*m*, 1H, H-10) และ 6.27 (*d*,  $J = 15.0$  Hz, 1H, H-11) สัญญาณโปรตอนในวงอะโรมาติก ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.73 (*m*, 1H, H-5'), 6.74 (*m*, 1H, H-6') และ 6.88 (*brs*, 1H, H-2') สัญญาณโปรตอน dioxymethylene ที่  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (*s*, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O) สัญญาณโปรตอนของหมู่ isobutyl ปรากฏที่  $\delta_{\text{H}}$  0.91 (*d*,  $J = 6.68$ , 6H, H-3''), 1.80 (1H, *m*, H-2''), 3.15 (*t*,  $J = 6.36$  Hz, 2H, H-1'') และ 5.78 (*brs*, 1H, N-H)

จาก  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบสัญญาณคาร์บอน (รูปที่ 3.15) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  20.3 (C-3''), 20.3 (C-4''), 28.5 (C-2''), 28.9-29.8 (C-7-C-8), 32.7 (C-6), 32.76 (C-11), 47.1 (C-1''), 101.1 (O-CH<sub>2</sub>-O), 105.6 (C-2'), 108.4 (C-5'), 120.4 (C-6'), 122.1 (C-2), 128.6 (C-4), 129.1 (C-12), 129.7 (C-13), 132.5 (C-1'), 141.3 (C-5), 142.9 (C-3), 146.7 (C-4'), 148.1 (C-3') และ 166.5 (C-1)

จากข้อมูลแมสสเปกตรัมที่พบไอออนพีคที่ ( $m/z$ ) 356.2174 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (cal.  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 356.2225) ของสาร **FK2** กับสาร pipericide ( $m/z$  [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> 355)<sup>[18]</sup> เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  สเปกตรัมของ สาร **FK5** กับสาร pipericide พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **FK5** คือ pipericide ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.16 ซึ่งเคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ จากรายงานของ Park และ คณะ (2002) โดยสามารถแยกสารประกอบนี้จากผลพริกไทย (*Piper nigrum*) และมีฤทธิ์ในการป้องกันยุงสามสายพันธุ์ (*Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* และ *A. togoi*)<sup>[19]</sup>





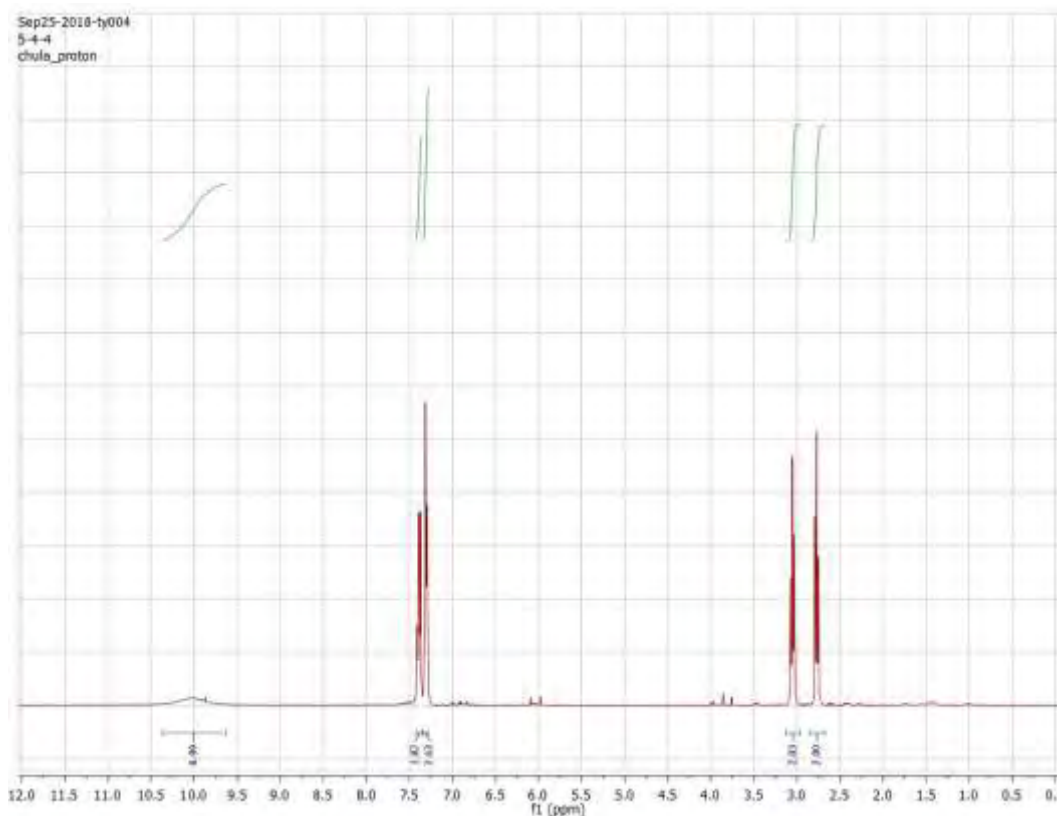
รูปที่ 3.16 โครงสร้างเคมีของสาร FK5

### 3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ FK6

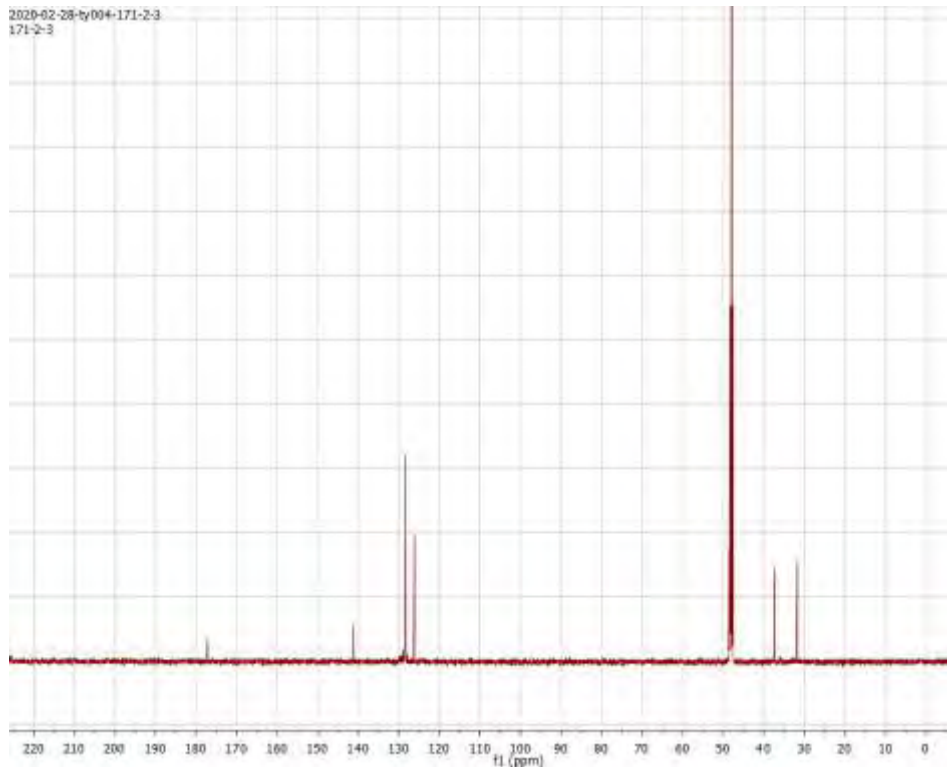
**FK6** มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาล จากข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.17 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ methylene ที่  $\delta_{\text{H}}$  2.53 (*t*,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-2) และ 2.97 (*t*,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-3) และสัญญาณโปรตอนในวงอะโรมาติกที่  $\delta_{\text{H}}$  7.18-7.31 (*m*, 5H, H-1' - H-5')

จาก  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบสัญญาณคาร์บอน (รูปที่ 3.18) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  31.4 (C-2), 36.9 (C-3), 125.7 (C-2', C-6'), 125.7 (C-3', C-5'), 126.0 (C-4'), 140.8 (C-1') และ 177.0 (C-1)

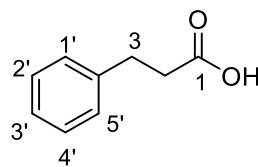
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร **FK6** กับสาร hydrocinamic acid พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร **FK6** คือ hydrocinamic acid ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.19 โดยเทียบข้อมูลกับงานวิจัยของ Monguchi และ คณะ (2011) ได้รายงานไว้<sup>[21]</sup>



รูปที่ 3.17  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร FK6



รูปที่ 3.18  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร **FK6**



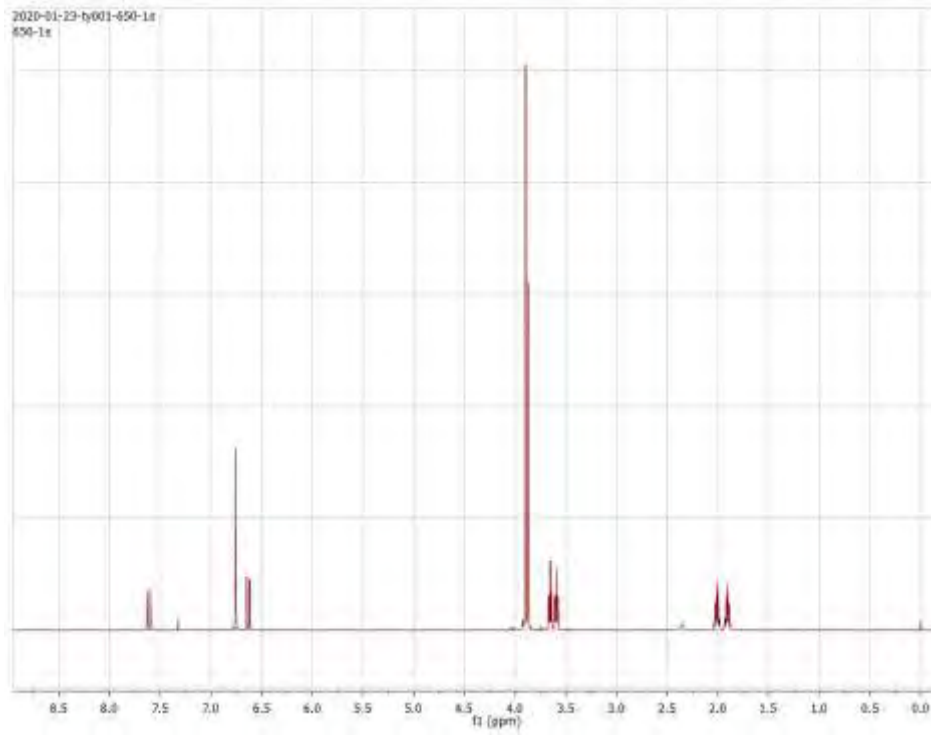
รูปที่ 3.19 โครงสร้างเคมีของสาร **FK6**

### 3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **FK7**

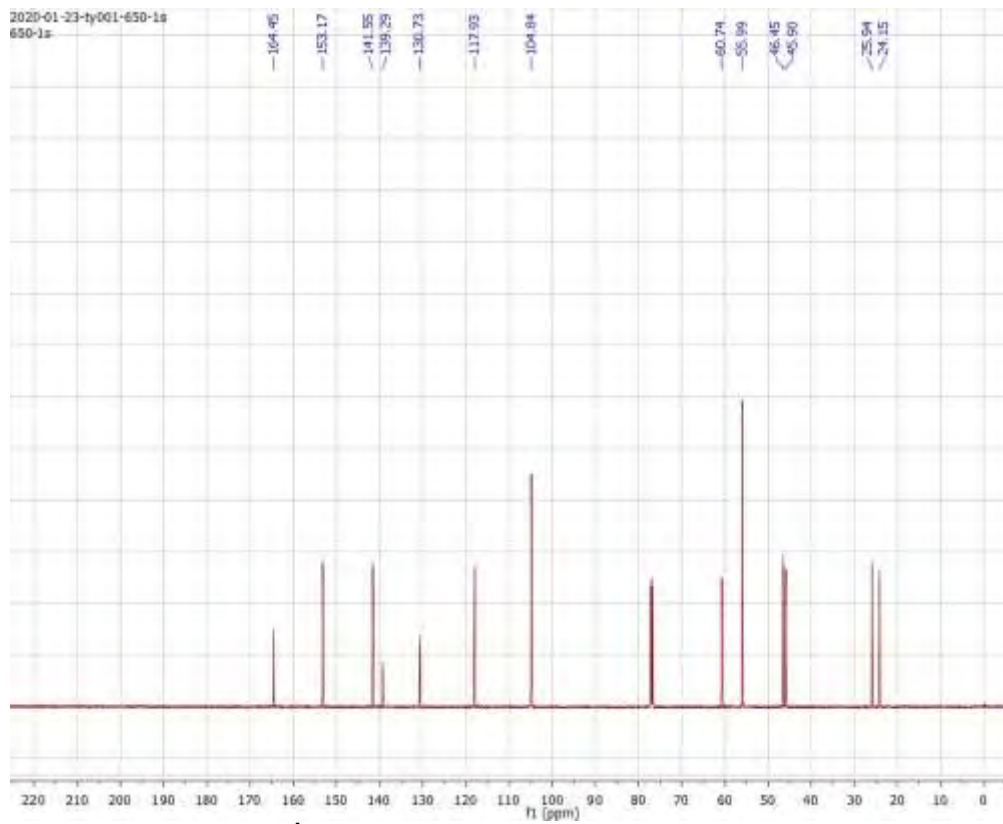
**FK7** มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี จากข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ดังรูปที่ 3.20 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของ *trans*-olefinic ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.63 (*d*,  $J = 15.4$  Hz, 1H, H-2) และ 7.61 (*d*,  $J = 15.4$  Hz, 1H, H-3) สัญญาณโปรตอนในวงอะโรมาติกที่  $\delta_{\text{H}}$  6.75 (*s*, 2H, H-5 และ H-9) สัญญาณโปรตอนของกลุ่ม methoxy ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.90 (*s*, 6H, 6-OMe, 8-OMe) และ 3.87 (*s*, 3H, 7-OMe) สัญญาณโปรตอนของวง pyrrolidine ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.91 (*quint*,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-3'), 2.01 (*quint*,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-2'), 3.56 (*t*,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-4') และ 3.65 (*t*,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-1')

จาก  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) พบสัญญาณคาร์บอน (รูปที่ 3.21) ดังนี้  $\delta_{\text{C}}$  24.2 (C-3'), 29.5 (C-2'), 45.9 (C-4'), 46.5 (C-1'), 56.0 (OMe-6), 56.0 (OMe-8), 60.7 (OMe-7), 104.8 (C-5), 104.8 (C-9), 117.9 (C-2), 130.7 (C-4), 139.3 (C-3), 141.6 (C-7), 153.2 (C-6), 153.2 (C-8) และ 164.5 (C-1)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร **FK7** กับสาร piperlotine C พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **FK7** คือ piperlotine C ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.22 ซึ่งเคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ จากรายงานของ Li และ คณะ (2007) โดยสามารถแยกสารประกอบนี้ จากใบชะพลู (*Piper lolot*) และมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด<sup>[13]</sup>

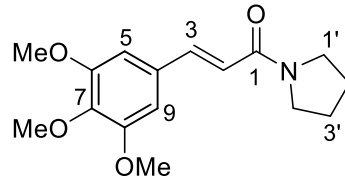


รูปที่ 3.20  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร FK7



รูปที่ 3.21  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร FK7





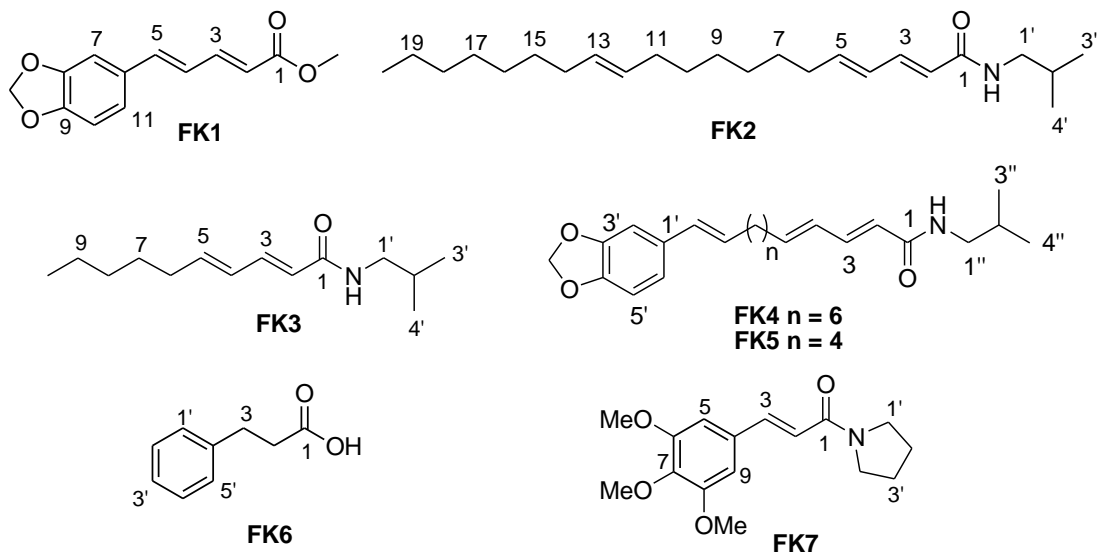
รูปที่ 3.22 โครงสร้างเคมีของสาร **FK7**

เนื่องจากสถานการณ์โรคระบาดโควิด 19 ทำให้นักวิจัยไม่สามารถพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารประกอบอื่นในผลชะพลูได้ จึงได้รายงานสารประกอบที่ทราบโครงสร้างอย่างแน่นอนเพียงสารเดียว

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการนำผลดีป्ली (*Piper retrofractum* Vahl.) และชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และนำส่วนที่สกัดมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีพบว่า สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีจากผลดีป्लीได้ 6 สาร เป็นสารใหม่ 1 สาร คือ **FK2** และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว จำนวน 5 สาร ได้แก่ methyl piperate (**FK1**), pellitorine (**FK3**), guineensine (**FK4**), pipericide (**FK5**) และ hydrocinamic acid (**FK6**) ดังรูปที่ 4.1 ในขณะที่สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจากผลชะพลูได้ 1 สาร ได้แก่ piperlotine C (**FK7**) (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากผลของดีป्लीและชะพลู

### ข้อเสนอแนะ

1. สิ่งสกัดจากไดคลอโรมีเทนยังมีสารที่คาดว่ามีความพิษทางชีวภาพที่น่าสนใจอยู่มาก โดยสามารถนำไปแยกต่อและพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารประกอบ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มีความจำกัด จึงไม่สามารถทำต่อได้
2. สารที่แยกได้บางตัวยังเป็นสารผสมที่คาดว่าสามารถพิสูจน์ทราบโครงสร้างต่อไปได้ จึงมีความน่าสนใจที่จะทำให้สารเหล่านั้นมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยนำไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีต่าง ๆ ต่อไป
3. สารที่แยกและพิสูจน์ทราบโครงสร้างแล้วนั้น ส่วนมากเป็นสารที่มีการรายงานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนหน้าแล้ว ซึ่งน่าสนใจที่จะนำสารที่แยกได้นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

## เอกสารอ้างอิง

1. Morikawa, T.; Matsuda, H.; Yamaguchi, I.; Pongpiriyadacha, Y.; Yoshikawa, M. New Amides and Gastroprotective Constituents from the Fruit of *Piper chaba*. *Planta Med.* **2003**, *70*, 152-159.
2. 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4120-4124.
3. Azlina, M. F.; Qodriyah, H. M.; Akmal, M. N.; Ibrahim, I. A.; Kamisah, Y. In Vivo Effect of *Piper sarmentosum* Methanolic Extract on Stress-Induced Gastric Ulcers in Rats. **2016**, *15*, 223-231.
4. Rukachaisirikul, T.; Siriwattanakit, P.; Sukcharoenphol, K.; Wongvein, C.; Ruttanaweang, P.; Wongwattanavuch, P.; Suksamrarn, A. Chemical Constituents and Bioactivity of *Piper sarmentosum*. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *93*, 173-176.
5. Vasavirama, K.; Upender, M. Piperine: A Valuable Alkaloid from Piper Species. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 34-38.
6. Dawid, C.; Henze, A.; Frank, O.; Glabasnia, A.; Rupp, M.; Buning, K.; Orlikowski, D.; Bader, M.; Hofmann, T. Structural and Sensory Characterization of Key Pungent and Tingling Compounds from Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2884-2895.
7. Phargarden. [online] ฟีปรี . <http://www.phargarden.com/main.php?action=contact> (accessed 3 April 2020)
8. Phargarden. [online] ชะพสุ. <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=221> (accessed 3 April 2020)
9. Kubo, M.; Ishii, R.; Ishino, Y.; Harada, K.; Matsui, N.; Akagi, M.; Kato, E.; Hosoda, S.; Fukuyama, Y. Evaluation of Constituents of *Piper retrofractum* Fruits on Neurotrophic Activity. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 769-773.
10. Muharini, R.; Liu, Z.; Lin, W.; Proksch, P. New Amides from the Fruits of *Piper retrofractum*. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2521-2525.
11. Tang, R.; Zhang, Y. Q.; Hu, D. B.; Yang, X. F.; Yang, J.; San, M. M.; Oo, T. N.; Kong, Y.; Wang, Y. H. New Amides and Phenylpropanoid Glucosides from the Fruits of *Piper retrofractum*. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2019**, *9*, 231-241.

12. Chanprapai, P; Chavasiri, W. Antimicrobial Activity from *Piper sarmentosum* Roxb. Against Rice Pathogenic Bacteria and Fungi. *J. Integr. Agric.* **2017**, *16*, 2513-2524.
13. Li, C. Y.; Tsai, W. J.; Damu, A. G.; Lee, E. J.; Wu, T. S.; Dung, N. X.; Thang, T. D.; Thanh, L. Isolation and Identification of Antiplatelet Aggregatory Principles from the Leaves of *Piper lolot*. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9436-9442.
14. Tuntiwachwuttikul, P.; Phansa, P.; Pootaeng, Y.; Talor, W. C. Chemical Constituents of the Roots of *Piper sarmentosum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 149-151.
15. Marshall, J. A.; Garofalo, A. W. Oxidation Cleavage of Mono-, Di-, and Trisubstituted Olefins to Methyl Esters through Ozonolysis in Methanolic NaOH. *J. Org. Chem.* **1998**, *58*, 3675-3680.
16. Lee, S. A.; Hwang, J. S.; Han, X. H.; Lee, C.; Lee, M. H.; Choe, S. G.; Hong, S.; Lee, D.; Lee, K. M.; Hwang, B. Y. Methylpiperate Derivatives from *Piper longum* and Their Inhibition of Monoamine Oxidase. *Arch. Pharmacol. Res.* **2008**, *31*, 679-683.
17. Kikuzaki, H.; Kawabata, M.; Ishida, E.; Akazawa, Y.; Takei, Y.; Nakatani, N. LC-MS Analysis and Structural Determination of New Amides from Javanese Long Pepper (*Piper retrofractum*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 1329-1333.
18. Su, H.; Horvat, R. Isolation, Identification, and Insecticidal Properties of *Piper nigrum* Amides. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 115-118.
19. 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. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1866-1870.
20. Narui, T.; Takeuchi, M.; Ishii, R.; Ishida, .; Okuyama, T. Studies on the Constituents of *Piper hancei* of Spice from Okinawa. *Nat. Med.* **1995**, *49*, 438-441.
21. Monguchi, Y.; Fujita, Y.; Hashimoto, S.; Ina, M.; Takahashi, T.; Ito, R.; Nozaki, K.; Maegawa, T.; Sajiki, H. Palladium on Carbon-Catalyzed Solvent-Free and Solid-Phase Hydrogenation and Suzuki-Miyaura Reaction. *Tetrahedron.* **2011**, *67*, 8628-86

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ ปริญา ทรัพย์บำรุง เกิดวันที่ 30 กรกฎาคม 2541 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากจากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) หลังจากนั้นเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ T.C. Tower ถนน 20 มิถุนา แขวงห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กทม. 10310 pangstm@hotmail.co.th