บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ

ตัวอย่างพืช

น้ำยางของต้นตาตุ่มทะเลเก็บจากบ้านท่านางหอม หมู่ 5 ตำบลน้ำน้อย อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

สารเคมี

ตัวทำละลายในการสกัดและการแยกสารเพื่อให้มีความบริสุทธิ์ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้จากการกลั่น ยกเว้นไดเอธิลอีเธอร์จะใช้ Analytical grade reagent ซิลิกาเจลสำหรับทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ ซิลิกาเจล (Merck) type 100 (0.063 – 0.200) ซิลิกาเจลสำหรับการทำโครมาโทกราฟีแบบแผ่นหนาใช้ ซิลิกาเจล 60 GF_{254} และแผ่นที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

2.2 อุปกรณ์

จุดหลอมเหลวทดสอบวัดด้วยเครื่อง Electrothermal melting point ใช้หน่วยเป็นองศาเซลเซียส ($^{\circ}$ซ)

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม (Ultraviolet Spectrum) วัดด้วยเครื่อง UV SPECORD S100 ใช้หน่วยความยาวคลื่นเป็นนาโนเมตร (nanometer, nm) และใช้ λ_{max} แทนค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงไว้มากที่สุดโดยใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย

อินฟราเรดสเปกตรัม (Infrared Spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง Perkin-Elmer FT-IR 783 โดยใช้ $CHCl_3$ และ KBr มีหน่วยเป็น wave number (cm^{-1}) การดูดกลืนแสงที่ได้แสดงลักษณะเป็น *s* (strong) และ *br* (broad)

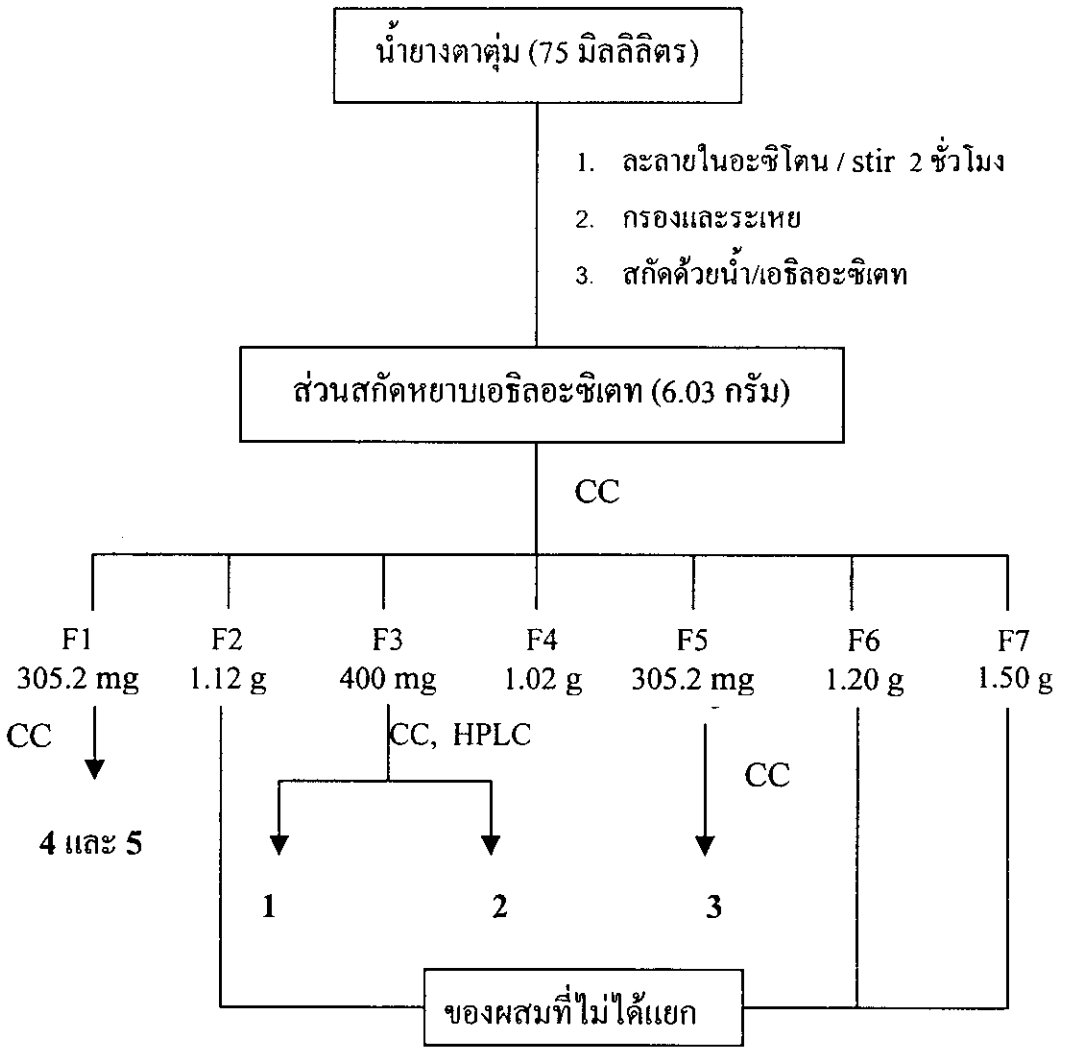
นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (Nuclear Magnetic Resonance Spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง FT-NMR 500 MHz VARIAN UNITY INOVA และ FT-NMR 300 MHz BRUKER AVANCE โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิงบอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ด้วยสัญญาณของ Chemical Shift parameter, δ (ppm) และใช้สัญญาณ *s* (singlet), *br* (broad), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quartet) และ *m* (multiplet)

2.3 วิธีการดำเนินการ

การสกัด และแยกสารเคมีจากยางต้นตาตุ่มทะเล (*Excoecaria agallocha* Linn.)

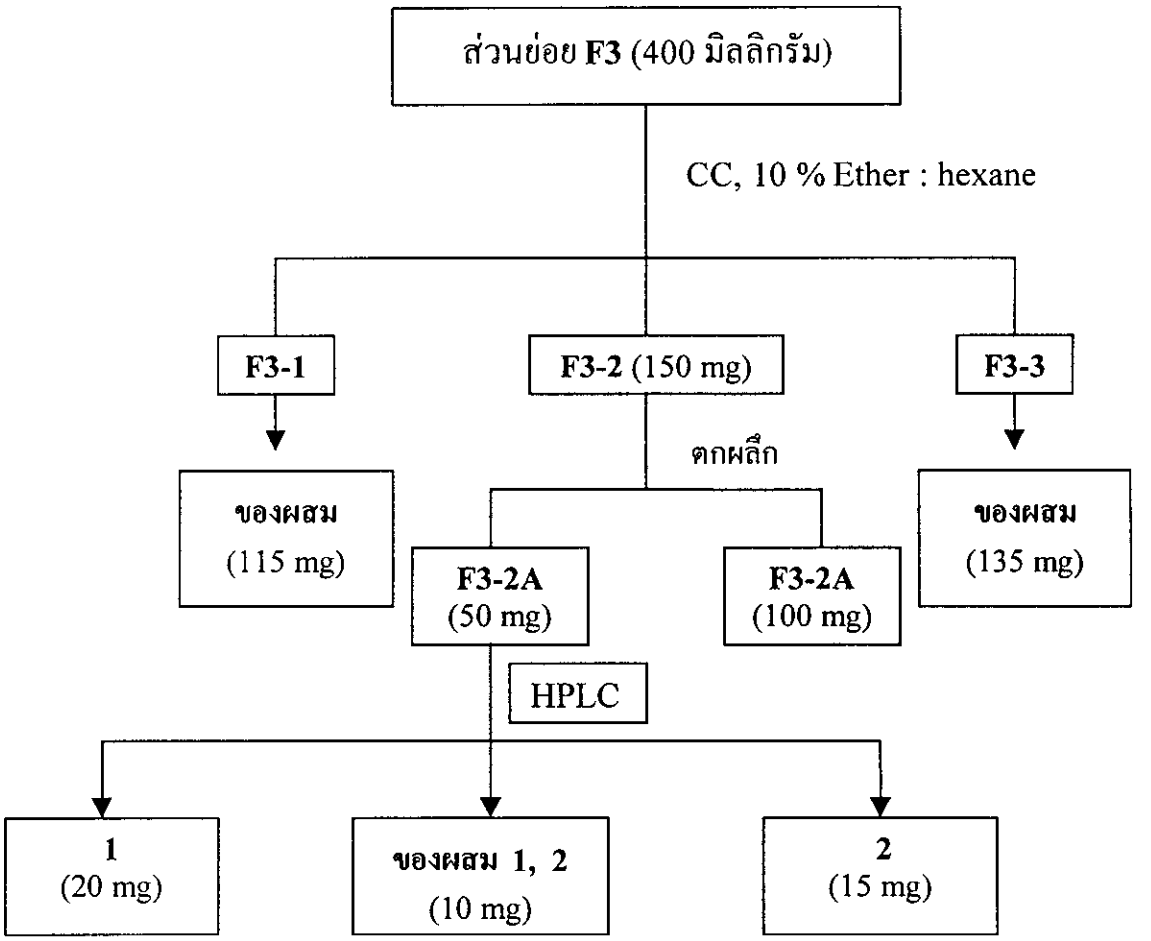
น้ำยางจากต้นตาตุ่มทะเลรวบรวมจากบ้านท่านางหอม ตำบลน้ำน้อย อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำแนกสกุล และชนิดโดย ศาสตราจารย์ ดร.พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำน้ำยาง (75 มิลลิลิตร) มาละลายในอะซิโตน 200 มิลลิลิตร แล้วคน (Stir) ด้วยเครื่องคนแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำของผสมที่ได้ไปกรอง นำสารละลายที่ได้ไประเหยโดยเครื่องระเหยแบบหมุน จะได้ของหนืดสีเหลือง จากนั้นนำของหนืดที่ได้ไปละลายด้วย เอธิลอะซิเตท 200 มิลลิลิตร เทสารละลายที่ได้ลงในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เกิดการสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด เก็บสารละลายชั้นเอธิลอะซิเตท จากนั้นนำสารละลายชั้นเอธิลอะซิเตทที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุนจะได้ส่วนสกัดเอธิลอะซิเตท (6.03 กรัม)

นำของหนืด (6.03 กรัม) ที่ได้มาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสมของอีเธอร์ในเฮกเซน และรองรับสารแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจะได้สารทั้งหมด 7 ส่วน ส่วนที่ 1, 3, 5 สามารถแยกสารบริสุทธิ์ **1, 2** และของผสม **3, 4** และ **5** ดังแสดงในแผนภาพ



แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดและการแยกสาร **1 – 5** จากยางของต้นตาตุ่มทะเล

ส่วนย่อย **F3** (400 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาทำโครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสม 10 % อีเธอร์ในเฮกเซนจะได้ส่วนย่อย 3 ส่วน ดังแสดงในแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 แสดงการแยกสารประกอบ **1 – 2**

ส่วนย่อยที่ F3-2 (150 mg) สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกแล้วแยกโดย HPLC โดยใช้ Hypersil ODS column ใช้ Refractive index detector และใช้ acetonitrile เป็น mobile phase (flow rate 1.0 ml/min) จะได้สารประกอบ **1** (20 mg, retention time = 20.53 min) และสารประกอบ **2** (15 mg, retention time = 22.85 min)

สารประกอบ **1** (ของแข็งสีขาว), mp : 227-229 °ซ

$[\alpha]_D^{25\circ}$: - 53° (*c* 0.01, $CHCl_3$)

IR (KBr) ν(cm^{-1}) : 3424 cm^{-1} (O-H stretching), 2863 cm^{-1} (C-H stretching), 850 cm^{-1} (trisubstituted double bond)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (500 MHz) : 5.19 (1H, *t, J* = 4 Hz), 3.42 (1H, *t, J* = 3 Hz), 1.97 (1H, *m*), 1.96 (1H, *m*), 1.94 (1H, *m*), 1.88 (2H, *m*), 1.74 (2H, *m*), 1.69 (1H, *m*), 1.67 (1H, *br s*), 1.56 (1H, *m*), 1.54 (1H, *m*), 1.43 (H, *m*), 1.43 (1H, *m*), 1.33 (1H, *m*), 1.33 (1H, *m*), 1.31(1H, *m*), 1.24 (1H, *dd, J* = 2,11 Hz), 1.23 (1H, *m*), 1.16 (3H, *s*), 1.03 (1H, *m*), 1.02 (1H, *m*), 1.01 (1H, *m*), 0.96 (3H, *s*), 0.95 (3H, *s*), 0.95(3H, *s*), 0.87 (3H, *s*), 0.87 (3H, *s*)0.85 (3H, *s*), 0.83 (3H, *s*)

^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (125 MHz) : 145.20, 121.77, 76.19, 48.94, 47.40, 47.20, 46.82, 41.78, 39.96, 37.37, 37.17, 37.02, 34.75, 33.35, 33.03, 32.52, 32.49, 31.10, 28.42, 28.28, 26.93, 26.15, 26.09, 25.23, 23.71, 23.45, 22.34, 18.31, 16.81, 15.29

DEPT – 135 ($CDCl_3$)

CH : 121.77, 76.19, 48.94, 47.40, 47.20

CH_2 :46.81, 37.17, 34.74, 33.02, 32.51, 26.93, 26.09, 25.23, 23.44, 18.31

CH_3 : 33.35, 28.41, 28.28, 26.15, 23.74, 22.34, 16.81, 15.29

สารประกอบ 2 (ของแข็งสีขาว) , mp : 110-112 ° ซ

$[\alpha]_D^{25\circ}$: - 47.2° (*c* 0.01, $CHCl_3$)

IR (KBr) ν(cm^{-1}) : 3424 cm^{-1} (O-H stretching), 2863 cm^{-1} (C-H stretching), 850 cm^{-1} (trisubstituted double bond)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (500 MHz) 5.15 (1H, *t, J* = 3.5 Hz), 3.43 (1H, *t*), 2.00 (1H, *m*), 1.93 (2H, *m*), 1.92 (1H, *m*), 1.89 (1H, *m*), 1.58 (1H, *m*), 1.57 (2H, *m*), 1.55 (1H, *s*), 1.42 (1H, *m*), 1.40 (1H, *m*), 1.36 (1H, *m*), 1.33 (1H, *m*), 1.33 (1H, *m*), 1.27 (1H, *m*), 1.25 (1H, *m*), 1.23 (1H, *m*), 1.16 (1H, *s*), 1.10 (3H, *m*), 1.02 (3H, *m*), 1.01 (1H, *m*), 0.98 (2H, *m*), 0.98 (3H, *s*), 0.98 (3H, *s*), 0.96 (1H, *s*), 0.96 (1H, *s*), 0.94 (3H, *d, J* = 6 Hz), 0.89 (1H, *m*), 0.89 (1H, *d, J* = 12 Hz), 0.88 (3H, *s*), 0.88 (3H, *s*), 0.87 (3H, *s*)0.81 (3H, *s*), 0.80 (3H, *d, J* = 6 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (125 MHz) : 139.54, 124.43, 76.16, 59.05, 48.90, 47.49, 42.14, 41.53, 40.15, 39.64, 37.35, 36.93, 33.73, 33.22, 32.79, 31.25, 28.75, 28.26, 28.09, 26.54, 25.22, 23.37, 23.24, 22.33, 21.39,21.38, 18.26, 17.44, 16.83, 15.45

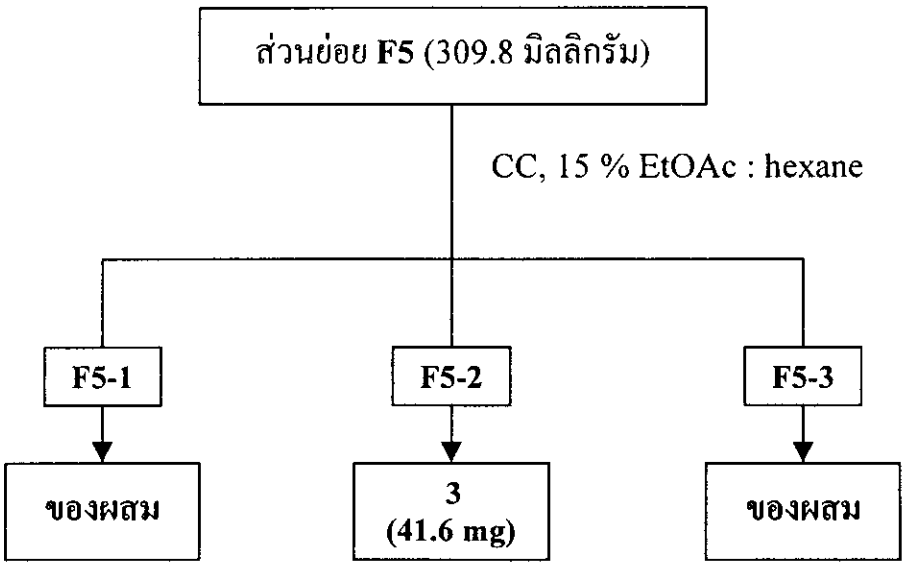
DEPT – 135 ($CDCl_3$)

CH : 124.43, 76.16, 48.90, 47.49, 39.64

CH_2 : 33.22, 32.79, 31.25, 28.75, 28.26, 26.54, 23.24, 22.33, 21.39

CH_3 : 28.09, 25.22, 23.37, 18.26, 17.44, 16.83, 15.45

ส่วนย่อย **F5** (309.8 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาทำโครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสม 15 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซนจะได้ส่วนย่อย 3 ส่วน ได้แก่ F5-1, F5-2 (**3**) และ F5-3 ดังแสดงในแผนภาพที่ 3



แผนภาพที่ 3 แสดงการแยกสารประกอบ 3

สารผสม 3 (ของหนืดสีเหลืองใส)

$[\alpha]_D^{25^\circ}$: + 50° (*c* 0.01, $CHCl_3$)

IR (neat) ν(cm^{-1}) : 3453 cm^{-1} (O-H stretching),
1733 cm^{-1} (C=O stretching ของ ester),
1696 cm^{-1} (C=O คอนจุเกตกับพันธะคู่)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (300 MHz) : 7.62 (1H, *m*), 5.02 (1H, *s*), 4.91(1H, *m*), 4.40 (1H, *m*), 4.30 (AB, *J* = 10.08 Hz) 4.26 (1H, *br s*), 3.85 (1H, *m*), 3.34 (1H, *d*), 2.96 (1H, *m*), 2.50(1H, *m*), 2.25 (1H, *m*), 1.80 (3H, *m*), 1.80 (3H, *m*), 1.70(1H, *m*), 1.18 (3H, *d*, *J* = 6 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz) : 130.06, 128.81, 128.64, 124.03, 122.77, 116.56, 114.11, 113.33, 84.37, 81.95, 79.58, 76.63, 72.32, 69.93, 65.74, 63.96, 59.27, 48.00, 40.89, 37.13, 36.66, 36.50, 36.40, 34.82, 34.17, 31.94, 28.46, 24.94, 24.70, 23.85, 23.37, 22.70, 20.38, 18.98, 14.12, 9.93, 7.93

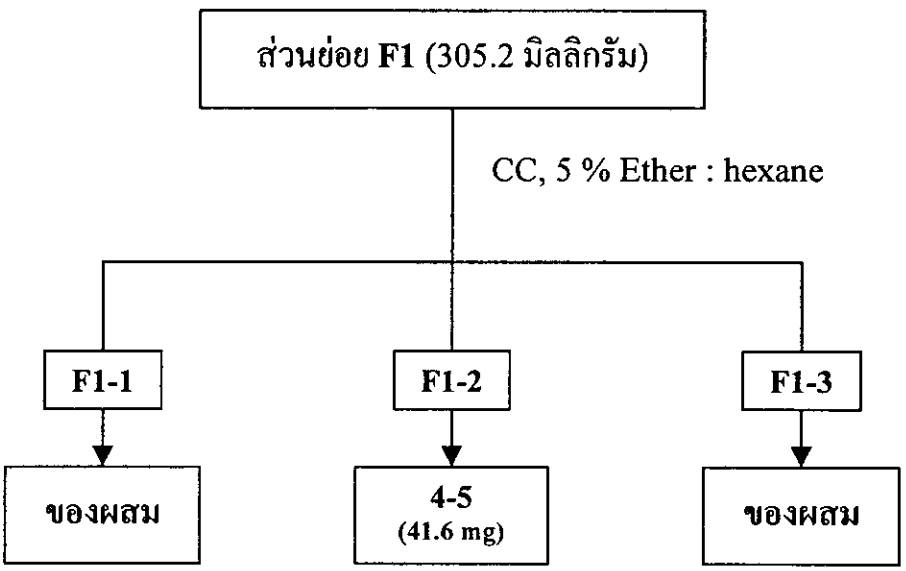
DEPT – 135 ($CDCl_3$) ของส่วนโครงสร้างหลัก (3)

CH : 161.02, 81.95, 69.93, 63.96, 48.00, 36.51, 34.81

CH_2 : 111.33, 65.74, 34.17

CH_3 : 20.38, 18.98, 9.93

ส่วนย่อย **F1** (305.2 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจะได้ส่วนย่อยทั้งหมด 3 ส่วน ดังแสดงในแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4 แสดงการแยกสารผสม **4** และ **5**

สารผสม **4** และ **5** (ของหนืดใสไม่มีสี)

IR (neat) ν(cm^{-1}) : 1702 cm^{-1}, 1656 cm^{-1} (C=O Stratching)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (500 MHz) : 5.25 (1H, *t*), 5.19 (1H, *dd*), 2.6(1H, *m*), 2.57 (1H, *m*), 2.44(1H, *m*), 2.39 (1H, *m*), 2.02 (1H, *m*), 1.94 (1H, *m*), 1.70 (1H, *m*), 1.64 (1H, *m*), 1.53 (1H, *m*), 1.44 (1H, *m*), 1.37(1H, *m*), 1.18 (3H, *s*), 1.13 (6H, *s*), 1.11 (6H, *s*), 1.10 (3H, *s*), 1.09 (6H, *s*), 1.06 (3H, *s*), 1.04 (1H, *s*), 0.95(3H, *s*), 0.91 (6H, *s*), 0.88 (3H, *s*), 0.84 (6H, *s*)

^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (125 MHz) : 217.94, 217.89, 145.28, 139.73, 124.19, 121.50, 59.12, 55.29, 55.24, 47.47, 47.44, 47.30, 46.91, 46.86, 46.77, 42.22, 41.85, 41.49, 39.98, 39.78, 39.69, 39.59, 39.48, 39.30, 37.10, 36.67, 36.61, 34.71, 34.23, 34.22, 33.79, 33.34, 32.52, 32.45, 32.16, 31.24, 31.10, 28.78, 28.43, 28.07, 26.91, 26.58, 26.57, 26.46, 26.12, 25.88, 23.68, 23.65, 23.54, 23.19, 21.52, 21.40, 19.65, 17.49, 16.83, 16.73, 15.48, 15.23