

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในหญ้าทะเล *E. acoroides*, *Halodule pinifolia* และ *Halophila ovalis* และสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. ตามขั้นตอนการศึกษาในบทที่ 4 นั้น ผู้วิจัยแบ่งการนำเสนอผลการวิจัยเป็น 4 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอย่างหยาบ

ส่วนที่ 2 ผลการสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์จากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล

ส่วนที่ 3 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ส่วนที่ 4 ผลการศึกษากการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอย่างหยาบ

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอย่างหยาบต่อการเจริญเติบโตของดินฝักกาดหอมและการทดสอบความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย ศึกษาเฉพาะในหญ้าทะเลชนิด *E. acoroides* และ *Halodule pinifolia* ส่วนหญ้าทะเล *Halophila ovalis* และสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. ไม่ได้ทำการศึกษา เนื่องจากหญ้าทะเล *Halophila ovalis* สารสกัดอย่างหยาบที่แยกมาได้มีปริมาณน้อย ส่วนสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. เคยมีรายงานการศึกษากการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นต่ออาร์ทีเมียและดินฝักกาดหอม โดยทดสอบในลักษณะเดียวกัน ซึ่งผลที่เคยรายงานพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของดินฝักกาดหอมและมีความเป็นพิษต่อเซลล์อาร์ทีเมียได้ค่อนข้างดี จึงนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวมาศึกษาเพื่อหาโครงสร้างที่มีฤทธิ์ดังกล่าว

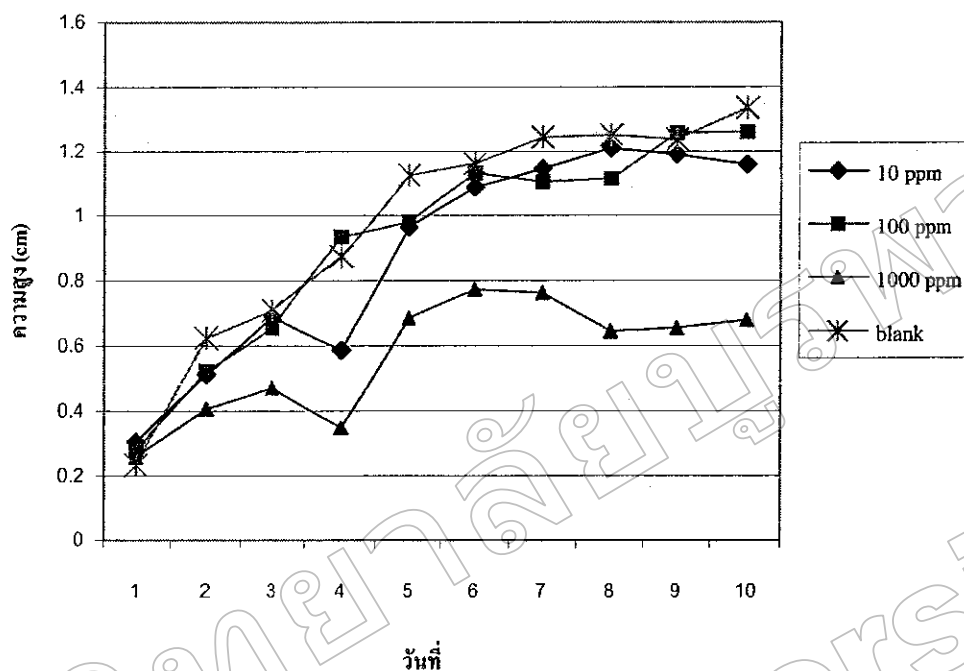
1. ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในดินฝักกาดหอม

ผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตของของดินฝักกาดหอม (วัดความสูงของลำต้น) ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm ของสารสกัดอย่างหยาบ *E. acoroides* และ *Halodule pinifolia* เทียบกับ Blank โดยบันทึกผลตั้งแต่วันที่ 6 มกราคม 2548 ถึง วันที่ 15 มกราคม 2548 (ผลการบันทึกแสดงในภาคผนวก ข) นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบและ Blank ดังแสดงในตารางที่ 4-1 และ ตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของต้นผักกาดหอม ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm ของสารสกัดอย่างหยาบ *E. acoroides* เทียบกับ Blank

วันที่	ความสูงเฉลี่ย (cm) แต่ละความเข้มข้นของ <i>E. acoroides</i>			Blank
	10 ppm	100 ppm	1,000 ppm	
1	0.30	0.28	0.26	0.23
2	0.51	0.52	0.41	0.62
3	0.69	0.65	0.47	0.71
4	0.59	0.93	0.35	0.87
5	0.96	0.98	0.68	1.13
6	1.09	1.13	0.77	1.16
7	1.15	1.11	0.76	1.24
8	1.21	1.12	0.64	1.25
9	1.19	1.26	0.65	1.24
10	1.16	1.26	0.68	1.34

จากตารางที่ 4-1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของต้นผักกาดแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบ *E. acoroides* ต่อวันเทียบกับ Blank ซึ่งได้จากการแปลผลข้อมูลตารางที่ ข-1 ถึง ข-5 (ภาคผนวก ข) จากข้อมูลในตารางที่ 4-1 เขียนเป็นกราฟเส้นได้ดังภาพที่ 4-1



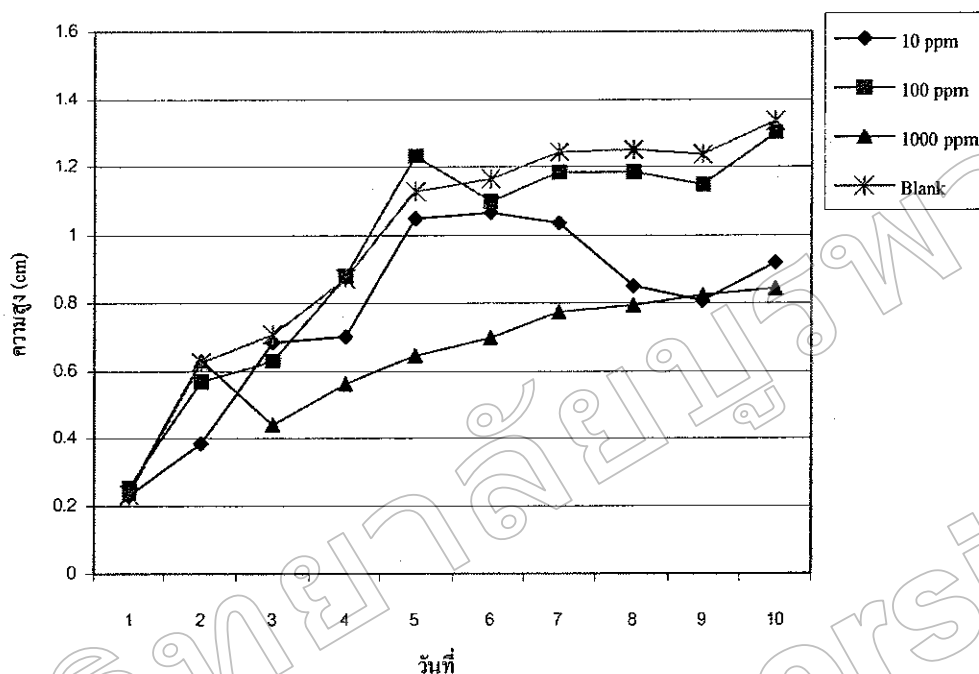
ภาพที่ 4-1 กราฟการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดอย่าง
หยาบ *E. acoroides* เทียบกับ Blank

จากภาพที่ 4-1 พบว่า Blank มีอัตราการเจริญเติบโตแต่ละวันมากที่สุด เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของต้นผักกาดไม่มีปัจจัยอื่นร่วม ส่วนสารสกัดอย่างหยาบ *E. acoroides* ที่ความเข้มข้น 10, 100, 1,000 ppm มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยแต่ละวันน้อยกว่า Blank ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีความแตกต่างอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2-10 แสดงว่าสารสกัดอย่างหยาบของ *E. acoroides* ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม โดยอาจมีสารที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม

ตารางที่ 4-2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของต้นผักกาดหอม ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm ของสารสกัดอย่างหยาบ *Halodule pinifolia* เทียบกับ Blank

วันที่	ความสูงเฉลี่ย (cm) แต่ละความเข้มข้นของ <i>Halodule pinifolia</i>			Blank
	10 ppm	100 ppm	1,000 ppm	
1	0.23	0.25	0.24	0.23
2	0.38	0.57	0.63	0.62
3	0.68	0.63	0.44	0.71
4	0.70	0.88	0.56	0.87
5	1.05	1.23	0.64	1.13
6	1.06	1.10	0.70	1.16
7	1.04	1.18	0.77	1.24
8	0.85	1.18	0.79	1.25
9	0.81	1.15	0.82	1.24
10	0.92	1.30	0.84	1.34

จากตารางที่ 4-2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของต้นผักกาดหอมแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบ *Halodule pinifolia* ต่อวันเทียบกับ Blank ซึ่งได้จากการแปลผลข้อมูลตารางที่ ข-1 ถึง ข-5 (ภาคผนวก ข) จากข้อมูลในตารางที่ 4-2 เขียนเป็นกราฟเส้นได้ดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 กราฟการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัด
อย่างหายา *Halodule pinifolia* เทียบกับ Blank

จากภาพที่ 4-2 พบว่า Blank มีอัตราการเจริญเติบโตแต่ละวันมากที่สุด เนื่องจาก
อัตราการเจริญเติบโตของต้นผักกาดไม่มีปัจจัยอื่นร่วม ส่วนสารสกัดอย่างหายา *Halodule pinifolia*
ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีความแตกต่างอย่างชัดเจน ตั้งแต่วันที่ 3-10 แสดงว่าสารสกัดอย่างหายา
ของ *Halodule pinifolia* ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม
โดยอาจมีสารที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม

2. ผลการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity Test) ต่ออาร์ทีเมีย

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย โดยใช้สารสกัดอย่างหยาบ *E. acoroides* และ *Halodule pinifolia* ที่ความเข้มข้น 10, 100, 1,000 ppm เทียบกับ Blank ที่เวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนอาร์ทีเมียที่ตายจากการทดสอบ 10 ตัว ต่อขวด ผลการทดสอบเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม 2547 แสดงดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 จำนวนอาร์ทีเมีย (ตัว) ที่ตายจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าทะเล *E. acoroides* และ *Halodule pinifolia* เทียบกับ Blank ที่เวลา 24 ชั่วโมง

สารสกัดอย่างหยาบ	ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนอาร์ทีเมียที่ตาย (ตัว) / ขวด					เฉลี่ย
		ขวด 1	ขวด 2	ขวด 3	ขวด 4	ขวด 5	
<i>E. acoroides</i>	10	6	5	5	6	4	5.2
	100	7	7	7	7	6	6.8
	1,000	7	5	7	6	5	6
<i>Halodule pinifolia</i>	10	3	3	3	1	7	3.4
	100	3	7	4	2	3	3.8
	1,000	2	5	4	4	2	3.4
Blank		4	6	7	2	6	5

จากตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบจำนวนอาร์ทีเมียตายเฉลี่ยต่อความเข้มข้น พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าทะเล *E. acoroides* ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm ทำให้อาร์ทีเมียที่ทดสอบ 10 ตัว/ ต่อขวด ตายเฉลี่ยความเข้มข้นละ 5, 7 และ 6 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกความเข้มข้นตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm ทำให้อาร์ทีเมียตายเฉลี่ยความเข้มข้นละ 3, 4 และ 3 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์พบว่าทุกความเข้มข้นตายน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Blank ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมมีผลทำให้อาร์ทีเมียตายเฉลี่ย 5 ตัว ต่อขวด คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์จากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล

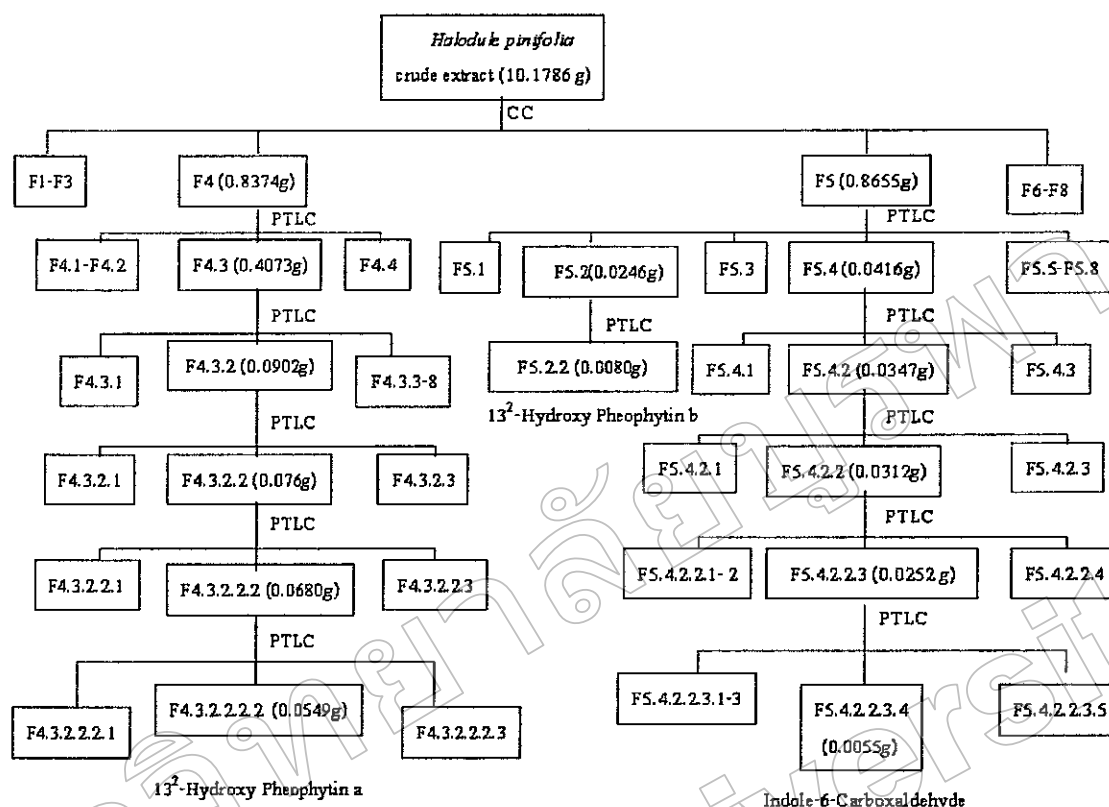
1. ผลการสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์จากหญ้าทะเล *E. acoroides* และ *Halophila*

ovalis

การสกัดหญ้าทะเล *E. acoroides* และ *Halophila ovalis* ใช้หญ้าทะเลสดน้ำหนัก 4,013 กรัม และ 342 กรัม ตามลำดับมาสกัดด้วย Methanol ที่อุณหภูมิห้อง และ Partition ด้วย Dichloromethane และ Ethyl Acetate ได้สารสกัดอย่างหยาบของ *E. acoroides* 6.0646 กรัม และ *Halophila ovalis* 0.7015 กรัม นำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลาย เริ่มจาก 100% Hexane แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณของ Ethyl Acetate ใน Hexane จนถึง 100% Ethyl Acetate และ 100% Methanol จากนั้นนำ Fraction ที่ 1 ที่ชะออกมากับ Hexane มาตกผลึกด้วย Hexane พบว่าให้ผลึกกัมมะถันรูปเข็มสีเหลืองอ่อน (S_8) จากหญ้าทะเล *E. acoroides* (0.0570 กรัม) และ *Halophila ovalis* (0.0190 กรัม)

2. ผลการสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์จากหญ้าทะเล *Halodule pinifolia*

การสกัดหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* ใช้หญ้าทะเลสดน้ำหนัก 2,036 กรัม สกัดด้วย Methanol ที่อุณหภูมิห้อง และ Partition ด้วย Dichloromethane และ Ethyl Acetate ได้สารสกัดอย่างหยาบ 10.1786 กรัม นำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลายเริ่มจาก 100% Hexane แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณของ Ethyl Acetate ใน Hexane จนถึง 100% Ethyl Acetate และ 100% Methanol พบว่าได้ทั้งหมด 8 Fraction (F1-F8) จากนั้นนำ Fraction ที่ 5 (0.8655 กรัม) ที่ชะออกมากับ 50% Ethyl Acetate ใน Hexane มาแยกด้วย PTLC 5 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลาย 5%, 3%, 5%, 3% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane และ 30% Ethyl Acetate ใน Hexane ตามลำดับ ได้สารบริสุทธิ์ Indole-6-Carboxaldehyde (0.0055 กรัม) นำ Fraction ที่ 5.2 (0.0246 กรัม) มาแยกด้วย PTLC ระบบตัวทำละลาย Dichloromethane ได้สารบริสุทธิ์ 13²-Hydroxy Pheophytin b (0.0080 กรัม) นำ Fraction ที่ 4 (0.8374 กรัม) ที่ชะออกมากับ 30% Ethyl Acetate ใน Hexane มาแยกด้วย PTLC 5 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลาย 15% Ethyl Acetate ใน Hexane, 4% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane, Dichloromethane, 2% และ 3% Ethyl acetate ใน Dichloromethane ตามลำดับ ให้สารบริสุทธิ์ 13²-Hydroxy pheophytin a (0.0549 กรัม) เพื่อความเข้าใจผู้วิจัยได้เขียนแผนผังแสดงการแยกสารบริสุทธิ์ Indole-6-Carboxaldehyde, 13²-Hydroxy Pheophytin a และ 13²-Hydroxy Pheophytin b ดังแสดงในภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 แผนผังแสดงการแยกสารบริสุทธิ์ Indole-6-Carboxaldehyde,
13²-Hydroxy Pheophytin a และ 13²-Hydroxy Pheophytin b

3. ผลการสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์จากสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp.

การสกัดและการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเล *Dictyota* sp. ได้สารในกลุ่ม Diterpene คือ 4,18-Dihydroxydictyolactone, 8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A และ 4 α -Hydroxycrenulide และสารในกลุ่ม Carotenoid คือ Fucoxanthin โดยนำสาหร่ายสดมาสกัดด้วย Methanol ที่อุณหภูมิห้อง และ Partition ด้วย Dichloromethane และ Ethyl Acetate ได้สารสกัดอย่างหยาบ 14.0478 กรัม นำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลายที่ใช้ Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate และ Methanol ได้ทั้งหมด 4 Fraction นำแต่ละ Fraction ไปตรวจสอบด้วย ¹H-NMR พบว่า Fraction 3 (สีส้ม 3.7716 กรัม) ที่ชะออกมากับ Ethyl Acetate มีสารบางกลุ่มที่น่าสนใจ จึงนำมาแยกต่อด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ Hexane, Dichloromethane, 50% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane, Ethyl Acetate และ Methanol โดยแยกตามแถบสี ได้ทั้งหมด 4 Fraction (F3.1-F3.4) นำ Fraction 3.2 (สีส้มแดง 1.3147 กรัม) มาแยกต่อด้วย PTLC ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น Dichloromethane ได้ 3 Fraction (F3.2.1-F3.2.3) นำ Fraction ที่ 3.2.2 (สีส้มแดง 0.5548 กรัม) มาแยกต่อด้วย PTLC ระบบ

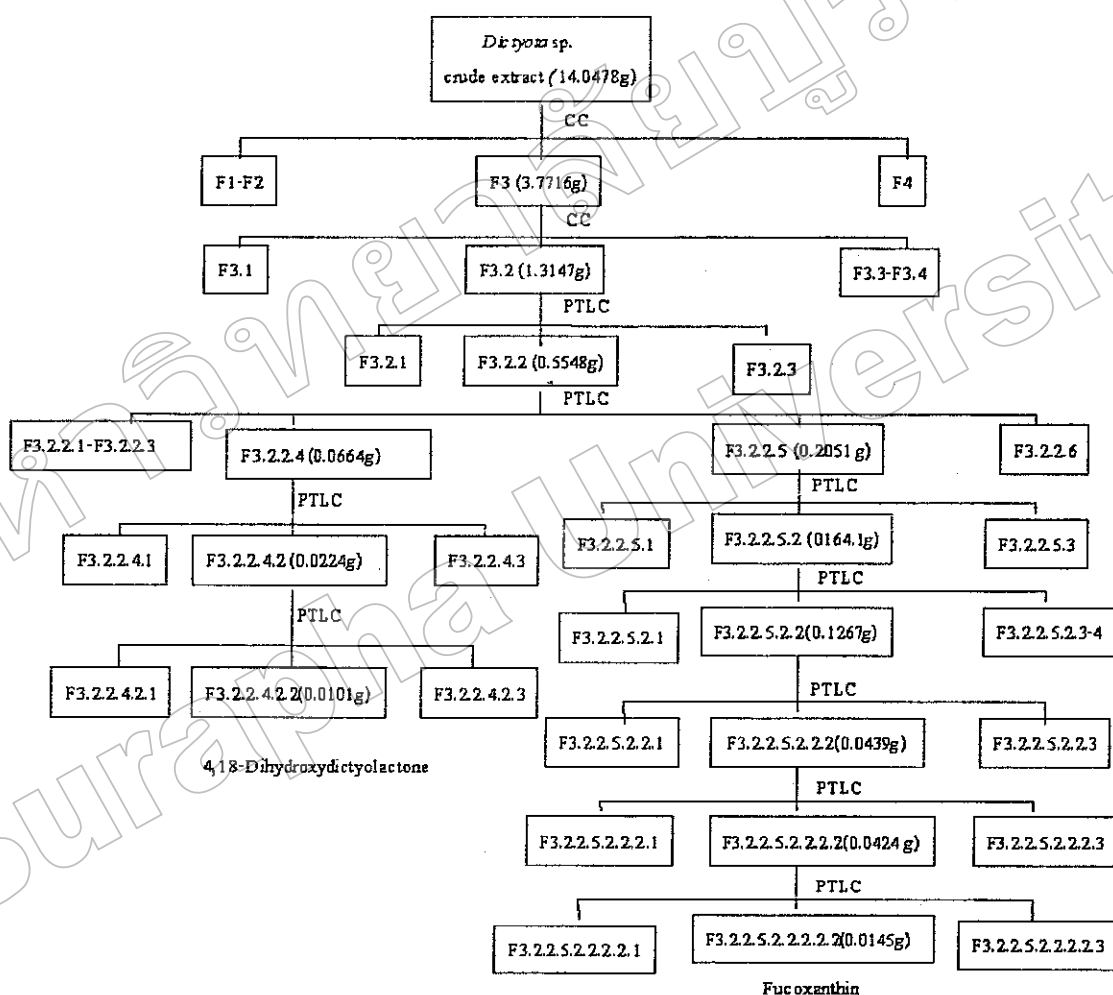
ตัวทำละลายเป็น 40% Ethyl Acetate ใน Hexane แยกได้ทั้งหมด 6 Fraction (F3.2.2.1-F3.2.2.6) นำ Fraction ที่ 3.2.2.4 (สีส้มแดง 0.0664 กรัม) มาแยกต่อด้วย PTLC 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลาย 40% Ethyl Acetate ใน Hexane ได้สารบริสุทธิ์ คือ 4,18-Dihydroxydictyolactone 0.0100 กรัม (ดังแสดงในภาพที่ 4-4) และหาสาร 4,18-Dihydroxydictyolactone เพิ่มจาก Fraction 3.1 (สีดําเหลือง 1.3961 กรัม) ที่ชะออกมากับ Hexane, Dichloromethane และ 50% Dichloromethane ใน Ethyl Acetate มาแยกต่อด้วย Flash Column Chromatography อีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลายเป็น Dichloromethane และ Ethyl Acetate โดยแยกตามแถบสีและทำ PTLC 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลาย 20% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane ได้ 4,18-Dihydroxydictyolactone อีก 0.0152 กรัม (ดังแสดงในภาพที่ 4-5) ดังนั้นน้ำหนักรวมที่แยกได้ทั้งสองครั้งเท่ากับ 0.0253 กรัม

สารในกลุ่ม Carotenoid แยกได้จากการนำ Fraction 3.2.2.5 มีสีส้มแดง 0.2051 กรัม มาแยกด้วย PTLC 5 ครั้ง ด้วยระบบตัวทำละลาย 50% Ethyl Acetate ใน Hexane, 5: 3: 2 Dichloromethane ใน Ethyl Acetate ใน Hexane, 25%, 30% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane และ 50% Ethyl Acetate ใน Hexane ได้สารบริสุทธิ์ Fucoxanthin 0.0145 กรัม (ดังแสดงในภาพที่ 4-4)

8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A แยกได้จากการนำ Fraction 3.1.2.3.4 (0.0948 กรัม) มาแยกด้วย PTLC 3 ครั้ง ครั้งแรกใช้ระบบตัวทำละลายเป็น 20% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane ครั้งที่สองและสามใช้ระบบตัวทำละลายเป็น 30% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane ได้ 8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A 0.0125 กรัม (ดังแสดงในภาพที่ 4-5) ซึ่งยังไม่บริสุทธิ์และมีปริมาณน้อยหาเพิ่ม โดยการนำสารสกัดอย่างหยาบของ *Dictyota* sp. น้ำหนัก 37.0930 กรัม มาแยกด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็น Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate และ Methanol ได้ทั้งหมด 4 Fraction (F1-F4) นำ Fraction 3 (8.6149 กรัม) ที่ชะออกมากับ Ethyl Acetate มาแยกด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็น Dichloromethane, 10%, 20%, 50% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane ได้ทั้งหมด 5 Fraction นำ แต่ละ Fraction ไปวิเคราะห์โดย $^1\text{H-NMR}$ พบว่า Fraction 3.2 (2.3433 กรัม) ที่ชะออกมากับ 10% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane เป็น Fraction ที่ต้องการหาปริมาณเพิ่ม จึงนำไปแยกต่อด้วย PTLC ระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็น 30% Ethyl Acetate ใน Hexane ได้ทั้งหมด 9 Fraction (F3.2.1-F3.2.9) นำ Fraction 3.2.4 (0.0592 กรัม) มาแยกด้วย Hexane กรองเอาส่วนที่ไม่ละลายใน Hexane ออกมาได้สารบริสุทธิ์ 8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A น้ำหนัก 0.0212 กรัม (ดังแสดงในภาพที่ 4-6)

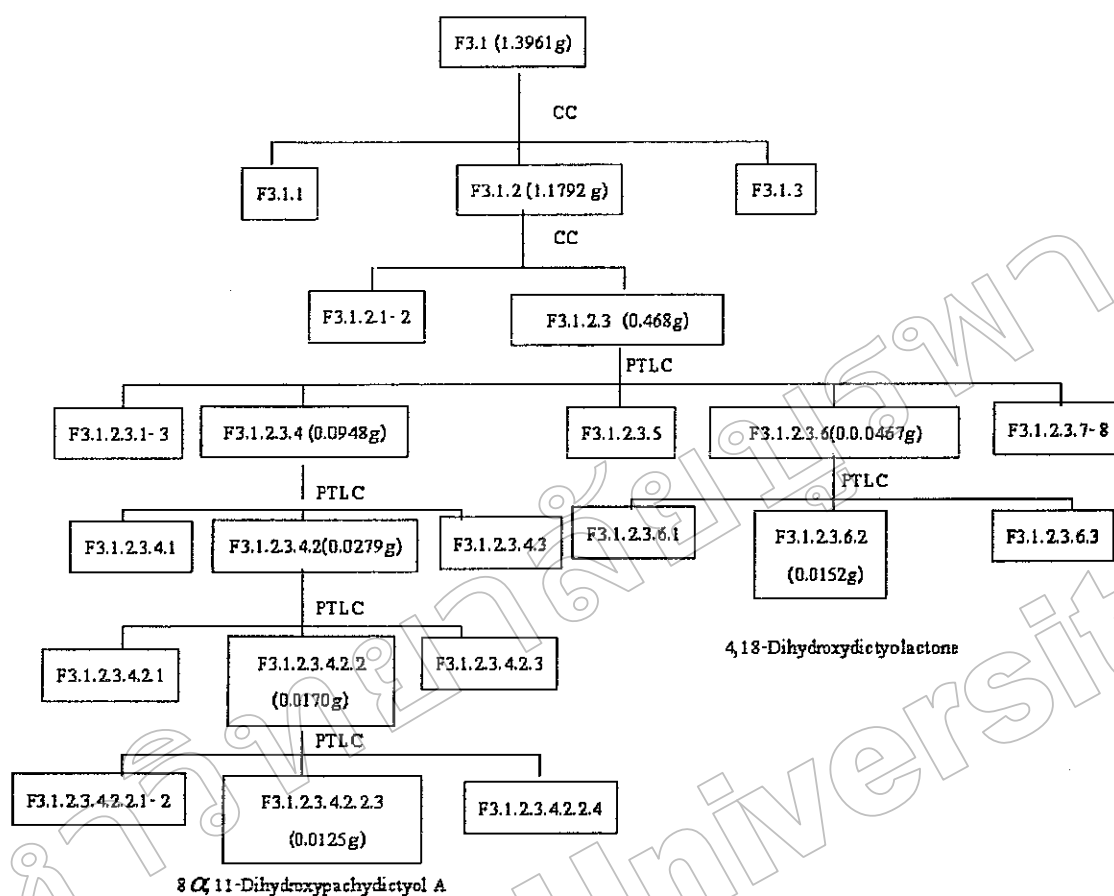
4 α -Hydroxycrenulide ได้จากการหา 8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A เพิ่ม โดยนำ Fraction ที่ 3.3 (2.3283 กรัม) ที่ชะออกมากับ 20% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane นำมาแยก

ต่อด้วย Flash Column Chromatography ระบบตัวทำละลาย Dichloromethane, 20% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane และ Ethyl Acetate ได้ทั้งหมด 4 Fraction (F3.3.1-F3.3.4) นำ Fraction 3.3.3 (0.2256 กรัม) ที่ชะออกมากับ 20% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane มาแยกต่อด้วย PTLC 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลาย 20% Ethyl Acetate ใน Dichloromethane, 30% Ethyl Acetate ใน Hexane (2 ครั้ง) ตามลำดับ จึงได้สารบริสุทธิ์ 4 α -Hydroxycrenulide 0.0042 กรัม ดังแสดงในภาพที่ 4-6

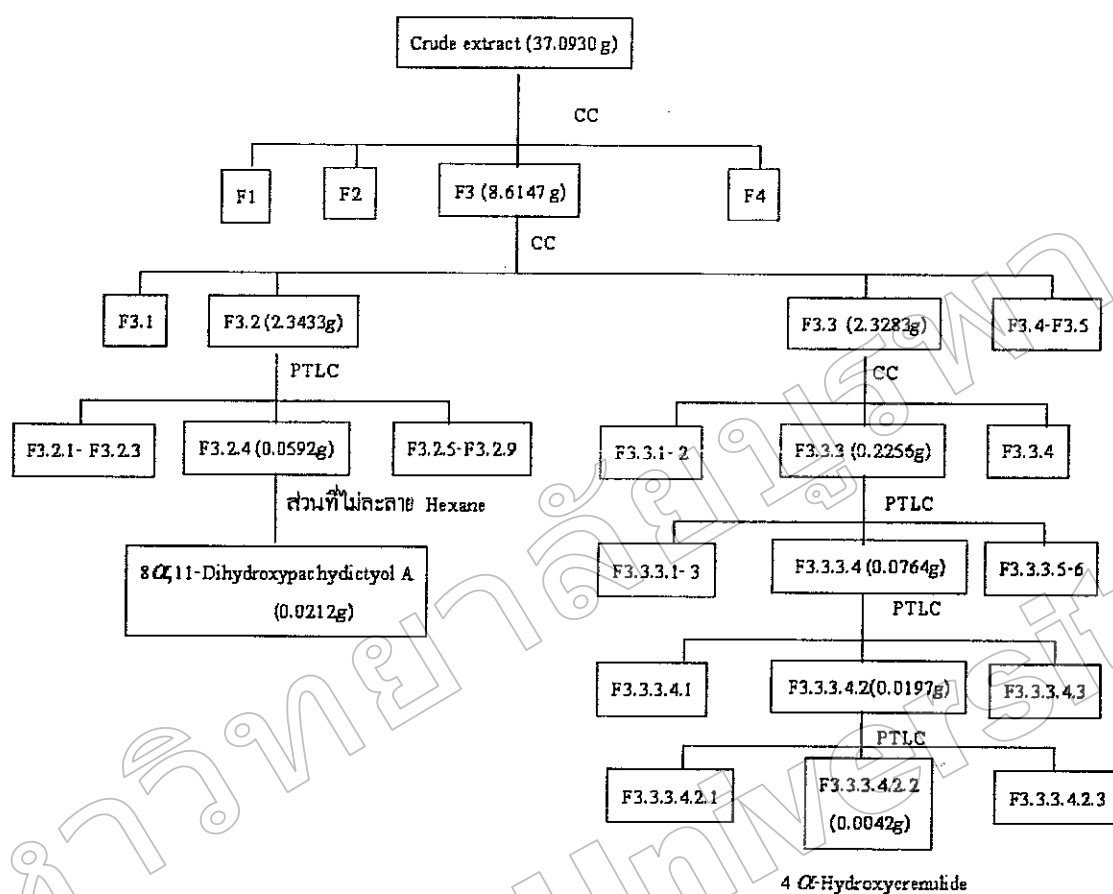


ภาพที่ 4-4 แสดงผังการแยกสารบริสุทธิ์ 4,18-Dihydroxydictyolactone และ Fucosanthin จาก

Dictyota sp.



ภาพที่ 4-5 แสดงผังการแยกสารบริสุทธิ์ 4,18-Dihydroxydictyolactone เพิ่มจาก Fraction 3.1 และ 8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A



ภาพที่ 4-6 แสดงผังการแยกสารบริสุทธิ์ 8α,11-Dihydroxypachydictyol A และ 4α-Hydroxycerenulide จาก *Dictyota* sp.

4. ค่า R_f ของสารบริสุทธิ์

ค่า R_f ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* และ สาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. โดยเช็คความบริสุทธิ์ด้วยระบบตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 แสดงค่า R_f ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล

สาร	ระบบตัวทำละลาย	ระยะทางที่เคลื่อนที่ (cm)		ค่า R_f
		สาร	ตัวทำละลาย	
Indole-6-Carboxaldehyde	30% EtOAc/Hexane	1.1	5.7	0.193
	4% EtOAc/CH ₂ Cl ₂	2.5	6.0	0.417
13 ² -Hydroxy Pheophytin a	20% EtOAc/Hexane	2.2	5.7	0.386
	30% EtOAc/Hexane	4.1	5.0	0.820
	40% EtOAc/Hexane	4.5	5.0	0.900
13 ² -Hydroxy Pheophytin b	20% EtOAc/Hexane	2.0	5.5	0.364
	30% EtOAc/Hexane	2.3	5.5	0.418
4,18-Dihydroxydictyolactone	50% EtOAc/Hexane	3.1	6.0	0.517
	20% EtOAc/CH ₂ Cl ₂	2.5	6.0	0.417
Fucoxanthin	40% EtOAc/CH ₂ Cl ₂	3.0	5.8	0.517
	50% EtOAc/CH ₂ Cl ₂	3.5	5.5	0.636
	60% EtOAc/Hexane	3.8	6.0	0.633
4 α -Hydroxycrenulide	40% EtOAc/Hexane	3.0	5.3	0.666
	50% EtOAc/Hexane	3.6	5.1	0.706
	25% EtOAc/CH ₂ Cl ₂	3.9	5.4	0.722

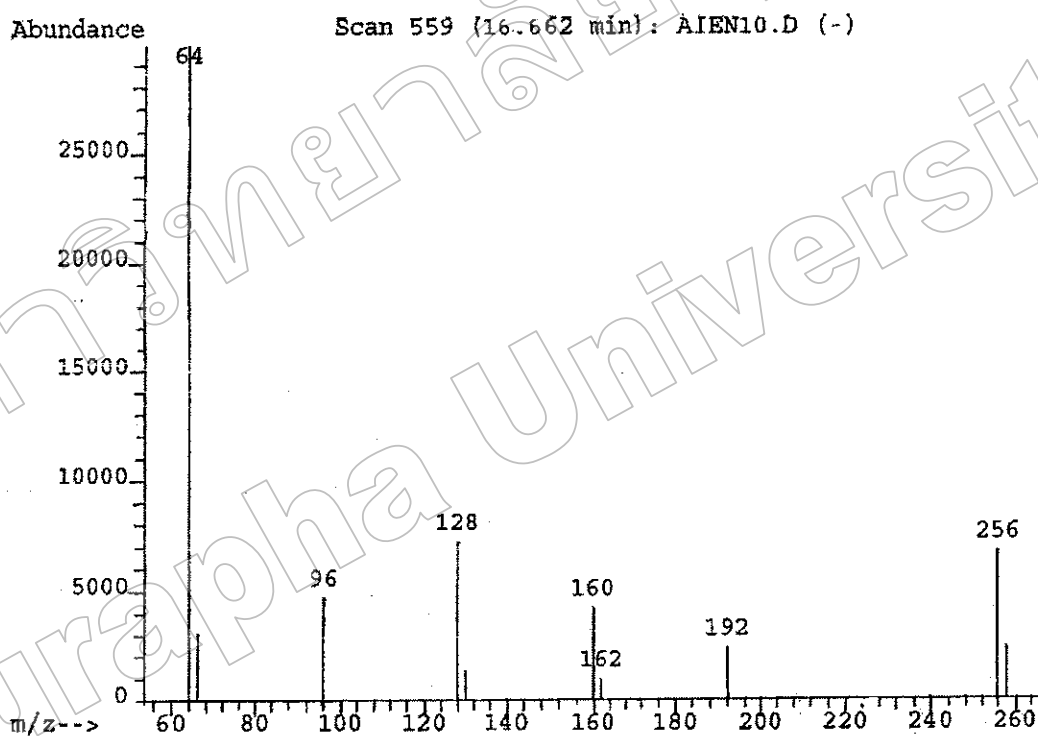
หมายเหตุ สารบริสุทธิ์ 8 α ,11-Dihydroxypachydictyol A ไม่ให้สีและไม่เรืองแสงใน UV จึงไม่สามารถหาค่า R_f ได้

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเล *E. acoroides*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* และ สาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างดังนี้

1. โครงสร้างของผลิตภัณฑ์กำมะถัน (S_8)

ผลิตภัณฑ์กำมะถัน (S_8) มีลักษณะเป็นรูปเข็มสีเหลืองอ่อน แยกได้จากหญ้าทะเล *E. acoroides* และ *Halophila ovalis* พิสูจน์เอกลักษณ์โดย GC-MS ให้ผล m/z เป็น 256, 192, 160, 128, 96, 64 (ภาพที่ 4-7) จากข้อมูลดังกล่าวยืนยันได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์กำมะถัน (S_8)

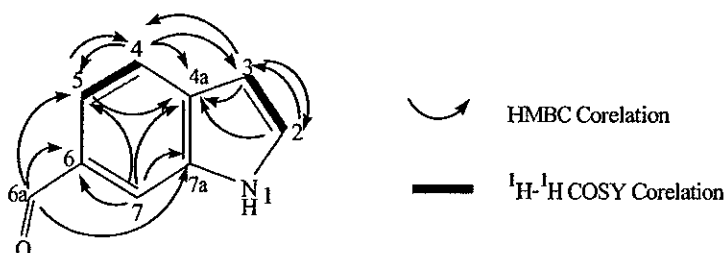


ภาพที่ 4-7 สเปกตรัมที่แสดง m/z ของผลิตภัณฑ์กำมะถัน S_8 จากเทคนิค GC-MS

2. โครงสร้างของ Indole-6-Carboxaldehyde

Indole-6-Carboxaldehyde มีลักษณะเป็นฟิล์มสีน้ำตาลอ่อน ๆ จากการวิเคราะห์สเปกตรัมโดยเทคนิค HR ESIMS ให้ m/z 146.0607 $[M+H]^+$ [Calcd C_9H_7NO ; 146.0606] จากเทคนิคนี้จึงได้สูตรโมเลกุลเป็น C_9H_7NO ซึ่งมีค่าความไม่อิ่มตัวเท่ากับ 7 ส่วน ^{13}C -NMR (ภาพที่ 4-10) แสดงจำนวนสัญญาณทั้งหมด 9 สัญญาณ และจากการวิเคราะห์ DEPT 90 และ DEPT 135 (ภาพที่ 4-10) ทำให้ทราบชนิดคาร์บอนแต่ละสัญญาณ คือเป็น sp^2 Methine Carbon 6 สัญญาณ (หนึ่งในจำนวนสัญญาณนี้ เป็นสัญญาณของ Carbonyl (C-6a) ที่ δ 185.2 และ sp^2 Quaternary Carbon 3 สัญญาณ ดังนั้นจากค่าความไม่อิ่มตัวและจำนวนพันธะคู่ โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวนี้เป็น Bicyclic จากนั้นหาความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMQC (ภาพที่ 4-11) ทำให้ทราบตำแหน่งโปรตอนของคาร์บอนแต่ละสัญญาณดังแสดงในตารางที่ 4-5 1H -NMR (ภาพที่ 4-9) แสดงสัญญาณของ sp^2 Methine Protons 5 สัญญาณ คือ ที่ δ 7.46 d (H-2), 7.36 d (H-3), 8.35 d (H-4), 7.35 d (H-5) และ 7.86 s (H-7) และมีหนึ่งสัญญาณที่เป็น Aldehyde คือที่ δ 10.07 s (H-6a)

ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค 1H - 1H COSY (ภาพที่ 4-13) และ HMBC (ภาพที่ 4-12) ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างได้สำเร็จ คือ 1H - 1H COSY พบความสัมพันธ์สองส่วนในวง Pyrrole คือ H-2 แสดงกับ H-3 และในวง Aromatic คือ H-4 แสดงกับ H-5 และเชื่อมต่อกับวง Pyrrole ที่ C-4a จากความสัมพันธ์คือ H-2, H-3, H-4, H-5 แสดงความสัมพันธ์กับ C-4a และที่ C-7a จากความสัมพันธ์คือ H-7 และ H-6a แสดงความสัมพันธ์กับ C-7a เมื่อพิจารณาที่ H-6a พบว่าแสดงกับ C-5, C-6 แสดงว่า C-6 มีหมู่ Aldehyde มาต่ออยู่ นอกจากนี้ C-6 ต่อกับ C-7 จากความสัมพันธ์คือ H-7 แสดงกับ C-6 และ C-5 ดังแสดงความสัมพันธ์ในภาพที่ 4-8 นอกจากนี้ข้อมูลที่ช่วยระบุตำแหน่งโครงสร้างได้สำเร็จที่ตำแหน่ง NH-1 ต่อกับ C-2 และค่า Chemical Shift ที่ตำแหน่งต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบจากการคำนวณโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ CS ChemDraw Ultra และโครงสร้างที่เคยมีรายงาน (Moyer, Shiurba, & Rapoport, 1986) จึงได้โครงสร้างของ Indole-6-Carboxaldehyde



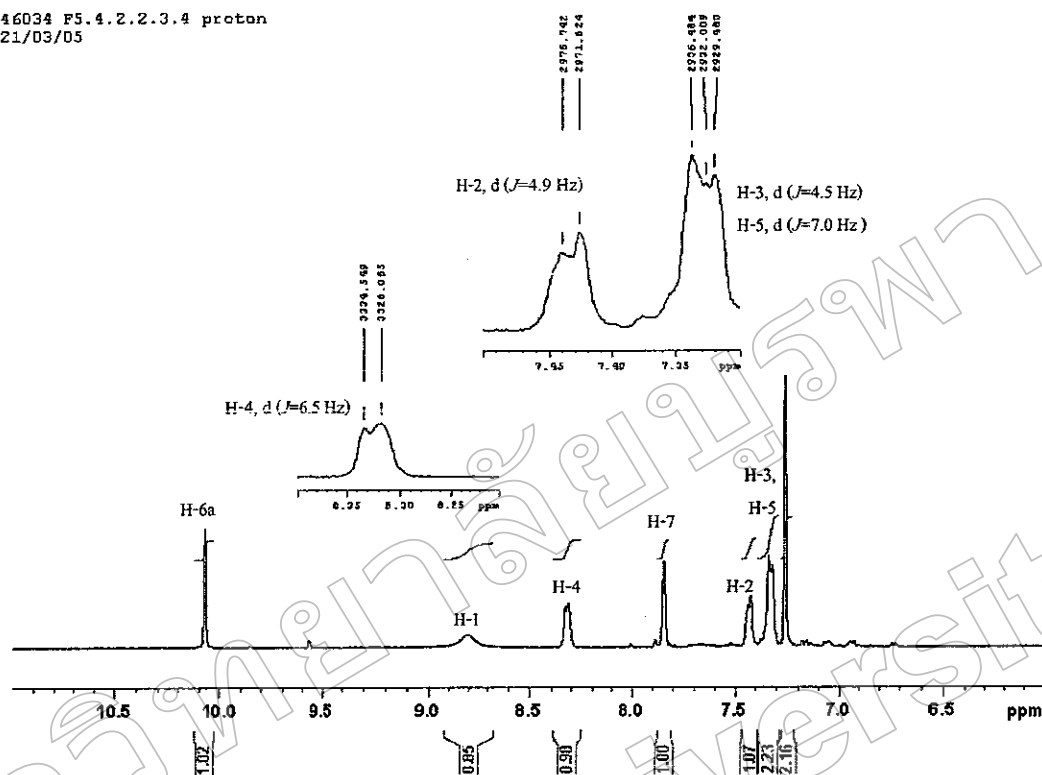
ภาพที่ 4-8 แสดงความสัมพันธ์โดย 1H - 1H COSY และ HMBC ของ Indole-6-Carboxaldehyde

ตารางที่ 4-5 ข้อมูลจากการวิเคราะห์สเปกตรัม ^{13}C , ^1H NMR, COSY และ HMBC

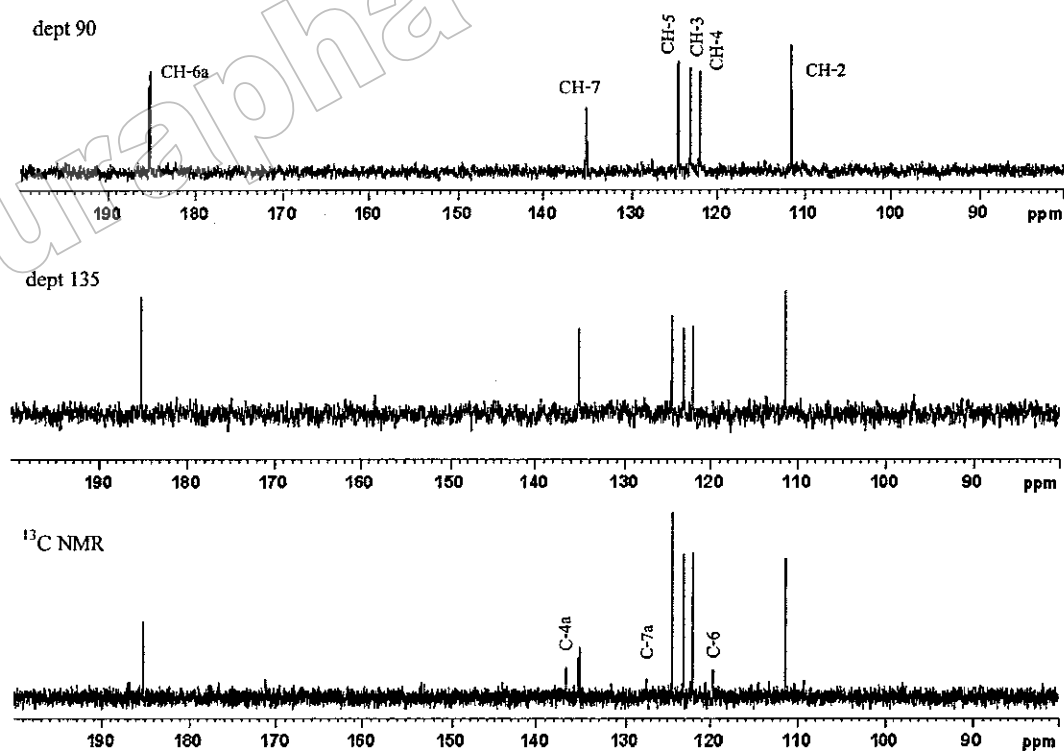
ของ Indole-6-Carboxaldehyde

No		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, $J=\text{Hz}$)	COSY	HMBC
1	NH	-	8.83 br s	-	-
2	CH	111.5	7.46 d ($J=4.9$)	H-3	C-3, C-4a
3	CH	123.1	7.36 d ($J=4.5$)	H-2	C-2, C-4a, C-4
4	CH	122.0	8.35 d ($J=6.5$)	H-5	C-5, C-4a, C-3
4a	C	136.6	-	-	-
5	CH	124.5	7.35 d ($J=7.0$)	H-4	C-4, C-4a
6	C	119.8	-	-	-
6a	CH	185.2	10.07 s	-	C-6, C-5, C-7a
7	CH	135.2	7.86 s	-	C-7a, C-4a, C-5, C-6
7a	C	128.0	-	-	-

46034 F5.4.2.2.3.4 proton
21/03/05

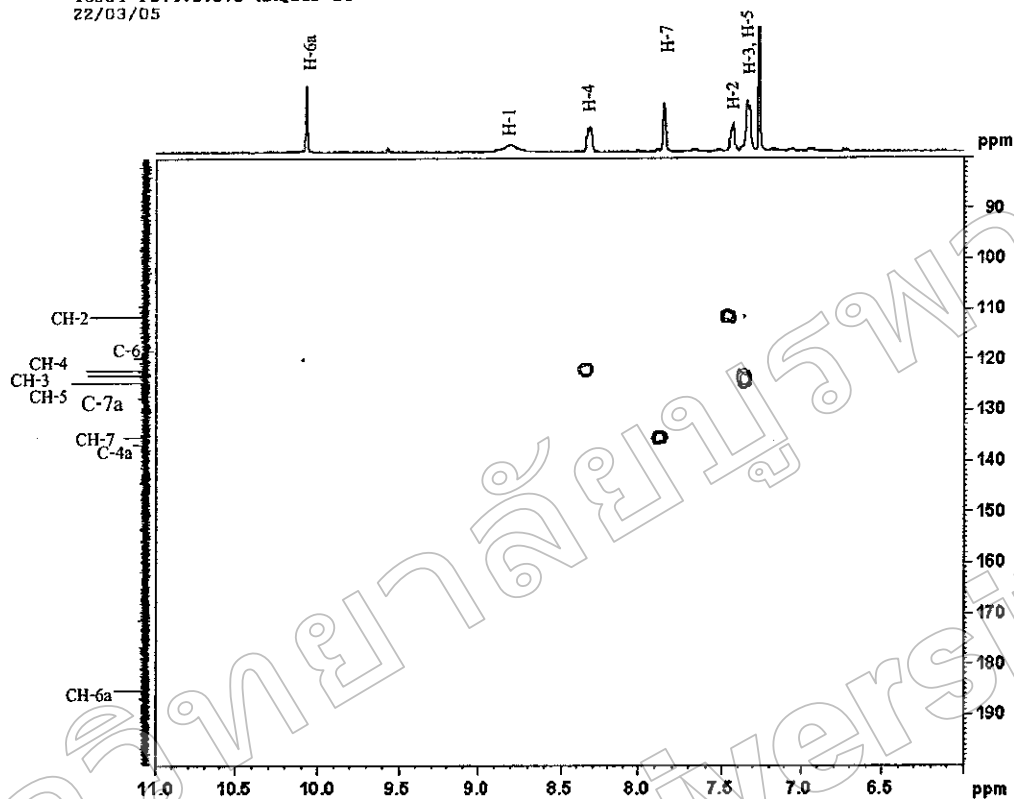


ภาพที่ 4-9 สเปกตรัม ^1H -NMR ของ Indole-6-Carboxaldehyde



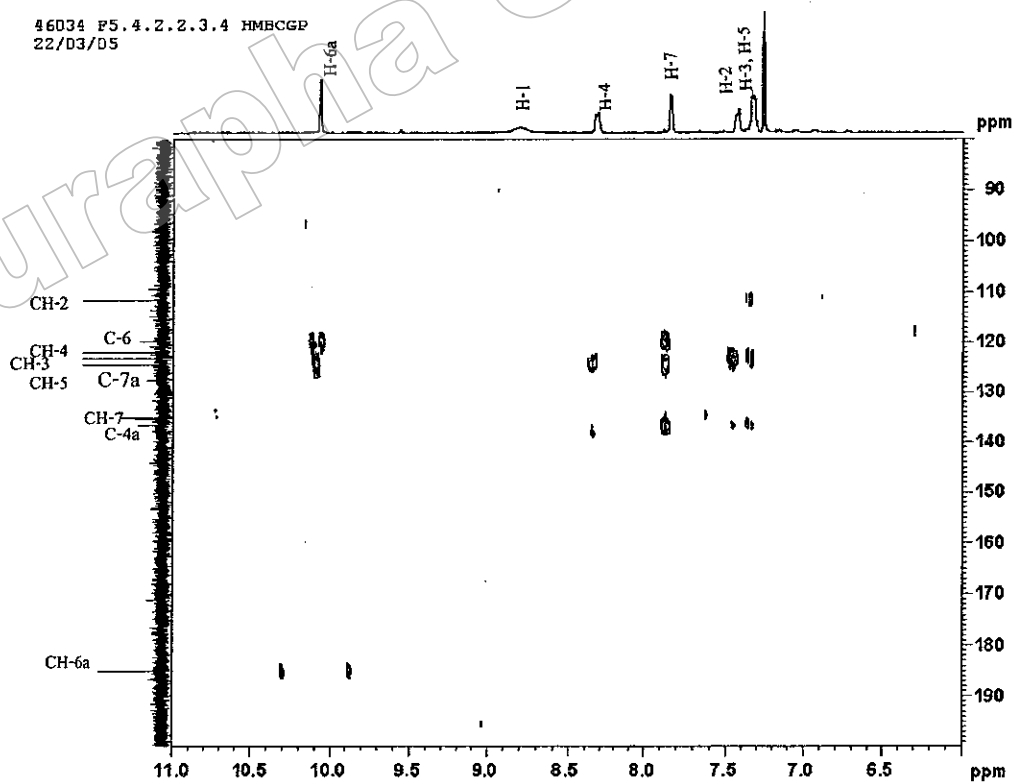
ภาพที่ 4-10 สเปกตรัม ^{13}C -NMR, DEPT 90 และ DEPT 135 ของ Indole-6-Carboxaldehyde

46034 F5.4.2.2.3 HMQC GP BU*
22/03/05

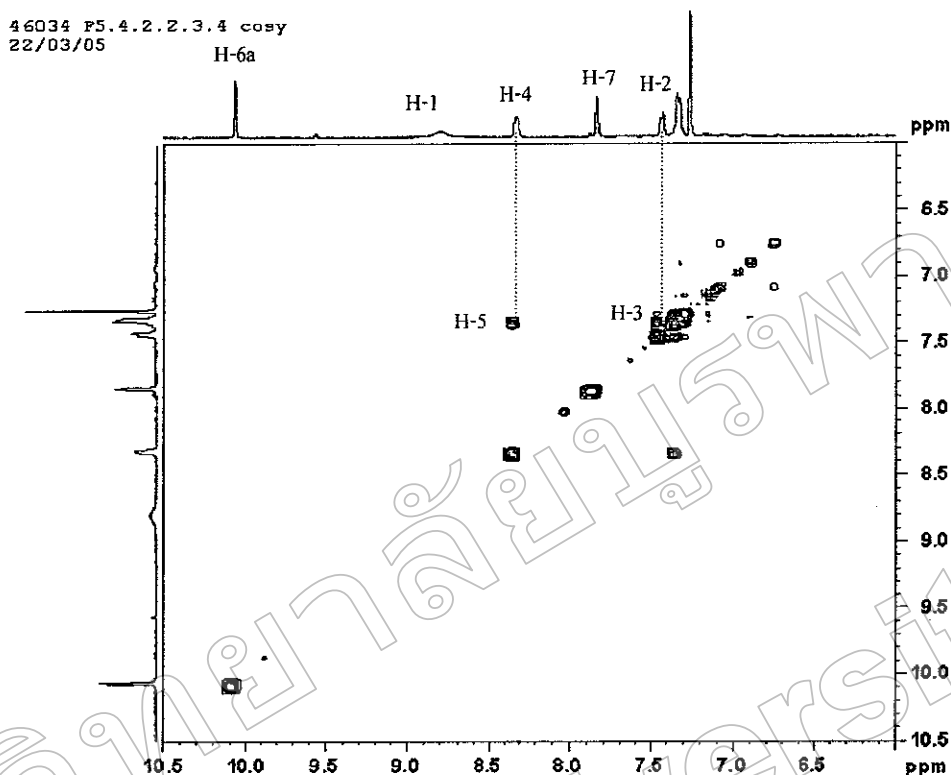


ภาพที่ 4-11 สเปกตรัม HMQC ของ Indole-6-Carboxaldehyde

46034 F5.4.2.2.3.4 HMBG GP
22/03/05



ภาพที่ 4-12 สเปกตรัม HMBC ของ Indole-6-Carboxaldehyde



ภาพที่ 4-13 สเปกตรัม COSY ของ Indole-3-Carboxaldehyde

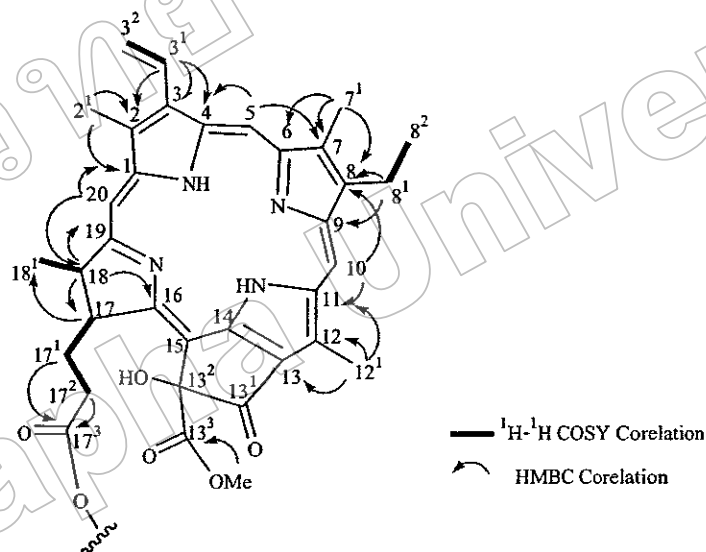
3. โครงสร้างของ 13²-Hydroxy Pheophytin a

จากการวิเคราะห์ที่โดย HR ESIMS ให้ m/z 887.5666 $[M+H]^+$ (Calcd $C_{55}H_{75}N_4O_6$; 887.5681) ได้สูตร โมเลกุล $C_{55}H_{74}N_4O_6$ สเปกตรัม ^{13}C NMR (ภาพที่ 4-18) แสดงจำนวนสัญญาณทั้งหมด 55 สัญญาณ จากเทคนิค DEPT 90 และ 135 (ภาพที่ 4-18) ทำให้ทราบชนิดคาร์บอน คือ Methyl Carbon 11 สัญญาณ Methylene Carbon 14 สัญญาณ Methine Carbon 10 สัญญาณ และ Quaternary Carbon 20 สัญญาณ นอกจากนี้สเปกตรัม ^{13}C NMR ยังแสดงสัญญาณของ sp^2 Carbon 25 สัญญาณ (3 สัญญาณ จากสัญญาณ sp^2 Carbon เป็น Carbonyl) จากนั้นหาความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMQC (ภาพที่ 4-19) ทำให้ทราบตำแหน่งโปรตอนของคาร์บอนแต่ละสัญญาณดังแสดงในตารางที่ 6 1H -NMR (ภาพที่ 4-17) แสดงสัญญาณของกลุ่ม Olefinic Methyl 4 สัญญาณ (หนึ่งในสัญญาณนี้เป็น Methyl ในส่วนของ Phytol) ที่ δ 3.4 ($H-2'$), 3.12 ($H-7'$), 2.05 ($H-12'$) และ 1.70 ($H-23'$) สัญญาณของส่วนที่เป็น Vinyl Group ที่ δ 7.85 q ($H-3'$), 6.23 d และ 6.14 d ($H-3''$) สัญญาณของ Olefinic 4 สัญญาณที่ δ 9.20 ($H-5$), 9.43 ($H-10$), 8.68 ($H-20$) และ 5.32 ($H-22$) สัญญาณของ Methoxy 1 สัญญาณที่ δ 3.70 ($-OMe$ ที่ต่อกับ $C-13'$)

จากเทคนิค 1H - 1H COSY (ภาพที่ 4-21) HMBC (ภาพที่ 4-20) และการเปรียบเทียบค่า Chemical Shift ที่มีรายงาน ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างได้สำเร็จ โดยแบ่ง

พิจารณาเป็นโครงสร้างย่อย 2 ส่วน คือ โครงสร้างย่อย a (วง Porphyrin) และโครงสร้างย่อย b (Phytyl)

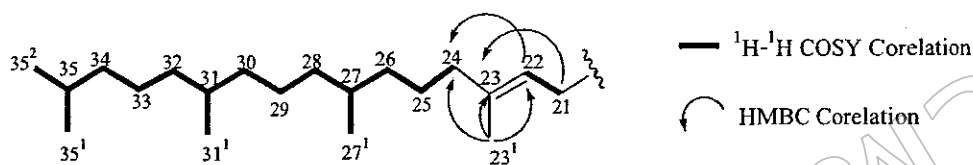
โครงสร้าง a จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค COSY ได้ความสัมพันธ์ 4 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง C-3' ต่อกับ C-3² (ซึ่งเป็นส่วนของกลุ่ม Vinyl) ส่วนที่สอง C-8' ต่อกับ C-8² ส่วนที่สาม C-17' ต่อกับ C-17 และ C-17² ส่วนที่สี่ C-18 ต่อกับ C-18' จากนั้นใช้ข้อมูลจาก HMBC เพื่อหาความสัมพันธ์จนได้โครงสร้างออกมา แต่จะมีบางส่วนของโครงสร้างที่เป็นคาร์บอนแบบ Quaternary ที่ไม่แสดงความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMBC เช่น ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-13¹, C-13², C-13³, C-14 และ C-15 เมื่อเปรียบเทียบค่า Chemical Shift กับโครงสร้างที่เคยมีรายงาน (Duan, Takaishi, Monota, Ohmoto, & Taki, 2002) (ตารางที่ ก-2 ในภาคผนวก ก) จึงได้โครงสร้างย่อย a ดังภาพที่ 4-14



ภาพที่ 4-14 แสดงความสัมพันธ์โดย ^1H - ^1H COSY และ HMBC ของโครงสร้างย่อย a (Porphyrin)

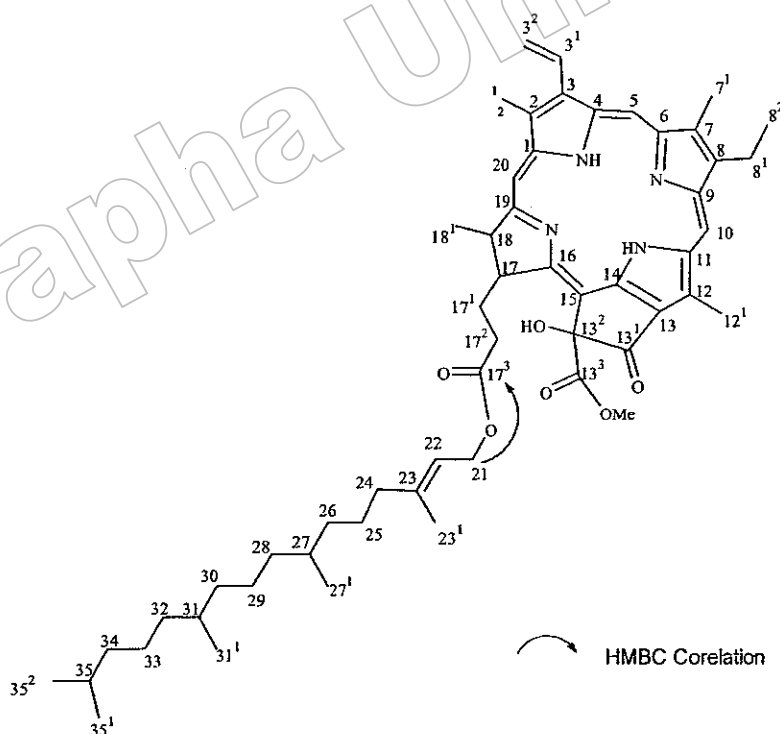
โครงสร้างย่อย b จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค COSY และการจัดตำแหน่งโดยเปรียบเทียบ Chemical Shift จาก CS ChemDraw Ultra (ตารางที่ ก-3 ในภาคผนวก ก) ได้ความสัมพันธ์ 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง C-21 ต่อกับ C-22 และส่วนที่สอง C-24 ต่อกับ C-25 จนถึง C-35 จากนั้นใช้เทคนิค HMBC เชื่อมต่อส่วนที่หนึ่งและส่วนที่สอง โดยผ่าน sp^2 Quaternary Carbon (C-23) ซึ่งพบว่า H-23' แสดงความสัมพันธ์กับ C-23, C-22 และ C-24 แสดงว่า C-23 มีหมู่

Methyl ($\text{CH}_3\text{-23}^1$) มาต่ออยู่ และ H-21, H-22 แสดงความสัมพันธ์กับ C-23 และ C-24 ตามลำดับ จึงได้โครงสร้างย่อย b ดังภาพที่ 4-15



ภาพที่ 4-15 แสดงความสัมพันธ์โดย $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY และ HMBC ของโครงสร้างย่อย b (Phytyl)

จากนั้นเชื่อมต่อโครงสร้าง a และ b โดยพิจารณาค่า Chemical Shift ที่ δ 61.7, 4.67 ($\text{CH}_2\text{-21}$) ซึ่งเป็น sp^3 Carbon ที่มีค่า Chemical Shift ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ข้อมูลจาก HMBC พบว่า H-21 แสดงความสัมพันธ์กับ C-17³ ที่เป็นหมู่ Carbonyl ของโครงสร้าง a จากค่า Chemical Shift และความสัมพันธ์ HMBC แสดงว่า C-21 เชื่อมต่อกับโครงสร้าง a โดยผ่าน Oxygen ของ Ester ดังแสดงในภาพที่ 4-16 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงได้โครงสร้างของ 13²-Hydroxy Pheophytin a



ภาพที่ 4-16 แสดงการเชื่อมต่อของโครงสร้าง a และ b โดยใช้ความสัมพันธ์ HMBC ของสาร 13²-Hydroxy Pheophytin a

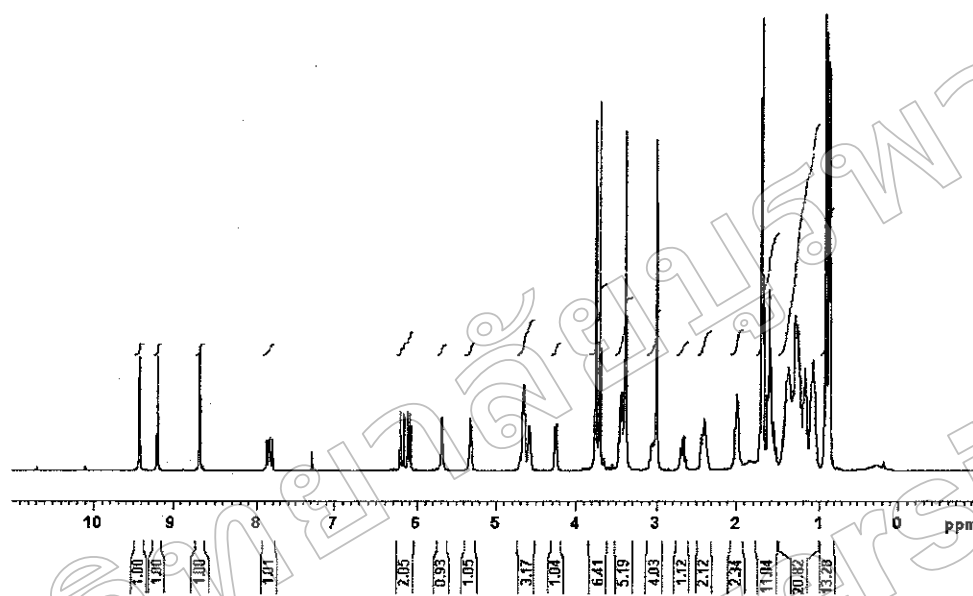
ตารางที่ 4-6 ข้อมูลจากการวิเคราะห์สเปกตรัม ^{13}C , ^1H NMR, COSY และ HMBC ของ
13²-Hydroxy Pheophytin a

No		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, $J = \text{Hz}$)	COSY	HMBC
1	C	142.1	-	-	-
2	C	131.7	-	-	-
2 ¹	CH ₃	12.0	3.40 s	-	C-2, C-3, C-4, C-1
3	C	136.1	-	-	-
3 ¹	CH	128.9	7.89 dd ($J=17.8, 11.5$)	H-3 ²	C-2, C-3, C-4
3 ²	CH ₂	122.7	6.23 d ($J=17.8$)	H-3 ¹	C-3, C-4
			6.14 d ($J=11.5$)	H-3 ¹	-
4	C	136.2	-	-	-
5	CH	97.8	9.20 s	-	C-3, C-7, C-4
6	C	154.9	-	-	-
7	C	136.2	-	-	-
7 ¹	CH ₃	11.0	3.02 s	-	C-7, C-8, C-6
8	C	144.9	-	-	-
8 ¹	CH ₂	19.2	3.45 q ($J=7.4$)	H-8 ²	C-8 ² , C-8, C-9
8 ²	CH ₃	17.3	1.61 m	H-8 ¹	-
9	C	150.6	-	-	-
10	CH	104.1	9.43 s	-	C-13, C-11, C-8
11	C	137.8	-	-	-
12	C	127.0	-	-	-
12 ¹	CH ₃	12.3	3.76 s	-	C-12, C13, C-11
13	C	129.4	-	-	-
13 ¹	C	192.1	-	-	-
13 ²	C	89.1	-	-	-
	-OH	-	5.65 br s	-	-
13 ³	C	172.9	-	-	-
	-OCH ₃	53.6	3.70 s	-	C-13 ³
14	C	149.9	-	-	-
15	C	107.8	-	-	-
16	C	162.6	-	-	-
17	CH	52.0	4.26 d ($J=8.3$)	H-17 ¹	C-19, C-17 ¹ , C-18 ¹

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

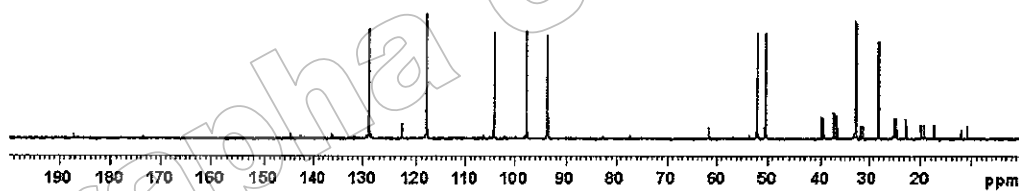
No		δ_c (ppm)	δ_H (ppm, $J=Hz$)	COSY	HMBC
17 ¹	CH ₂	31.8	2.41 m	H-17 ² , H-17	C-17 ³ , C-17 ² , C-18
17 ²	CH ₂	31.3	2.68 m	H-17 ¹	C-17 ³ , C-17 ¹ , C-17
			3.01 m	H-17 ¹	-
17 ³	C	173.7	-	-	-
18	CH	50.4	4.59 q ($J=7.4$)	H-18 ¹	C-18 ¹ , C-17 ² , C-17, C-16, C-19
18 ¹	CH ₃	22.6	1.68 s	H-18	C-18
19	C	172.5	-	-	-
20	CH	93.1	8.68 s	-	C-18, C-2, C-1
21	CH ₂	61.7	4.67 t ($J=5.6$)	H-22	C-22, C-23, C-17 ³
22	CH	118.0	5.32 t ($J=6.8$)	H-21	C-23 ¹ , C-24
23	C	142.8	-	-	-
23 ¹	CH ₃	16.4	1.70 s	-	C-24, C-22, C-23
24	CH ₂	39.9	1.99 s	-	C-22, C-23
25	CH ₂	24.8	11.17 m	-	-
26	CH ₂	37.5	1.14 m	-	-
27	CH	32.8	1.39 m	H-27 ¹	-
27 ¹	CH ₃	19.8	0.89 t ($J=6.6, 6.3$)	H-27	C-27, C-26
28	CH ₂	36.7	1.39 m	-	-
29	CH ₂	24.6	1.29 m	-	-
30	CH ₂	37.3	1.14 m	-	-
31	CH	32.7	1.39 m	H-31 ¹	-
31 ¹	CH ₃	19.7	0.89 t ($J=6.6, 6.3$)	H-31	C-31
32	CH ₂	37.4	1.14 m	-	-
33	CH ₂	24.4	1.29 m	-	-
34	CH ₂	39.4	1.17 m	-	C-33, C-32
35	CH	28.0	1.55 m	-	C-34, C-35 ¹ , C-35 ²
35 ¹	CH ₃	22.7	0.92 d ($J=6.6$)	H-35	C-35, C-34
35 ²	CH ₃	22.7	0.92 d ($J=6.6$)	H-35	C-35, C-34

46034 F4.3.2.2.2.2 proton
29/03/05

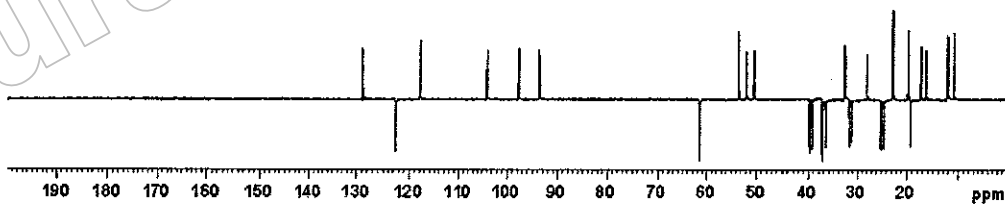


ภาพที่ 4-17 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin a

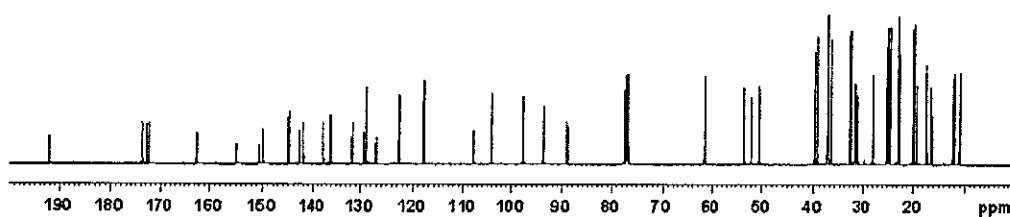
dept 90



dept 135

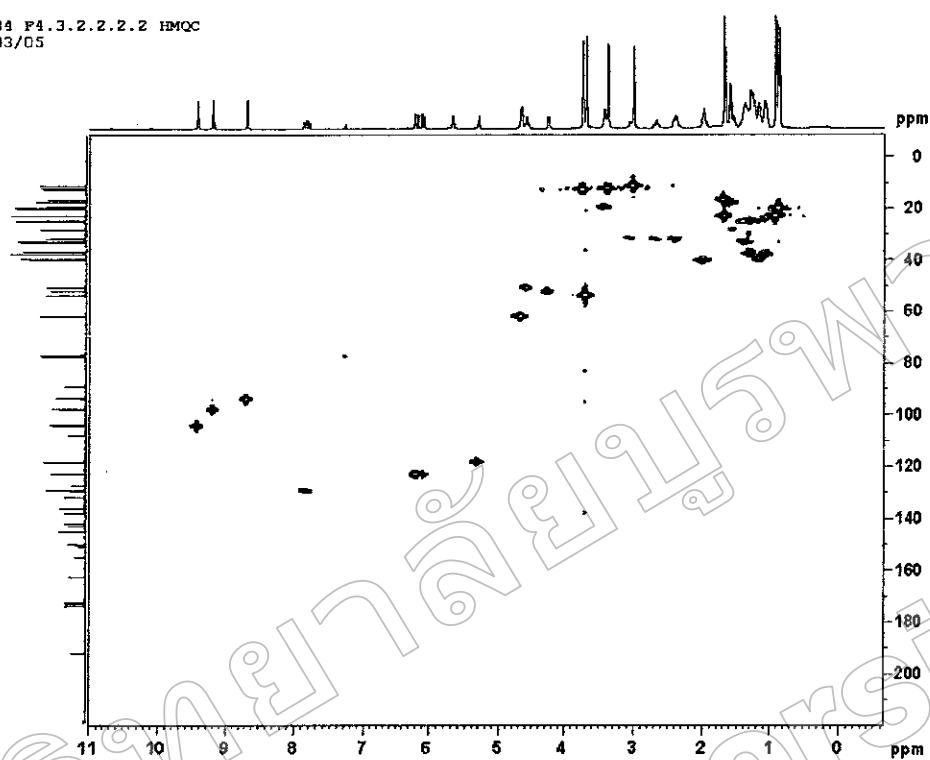


carbon



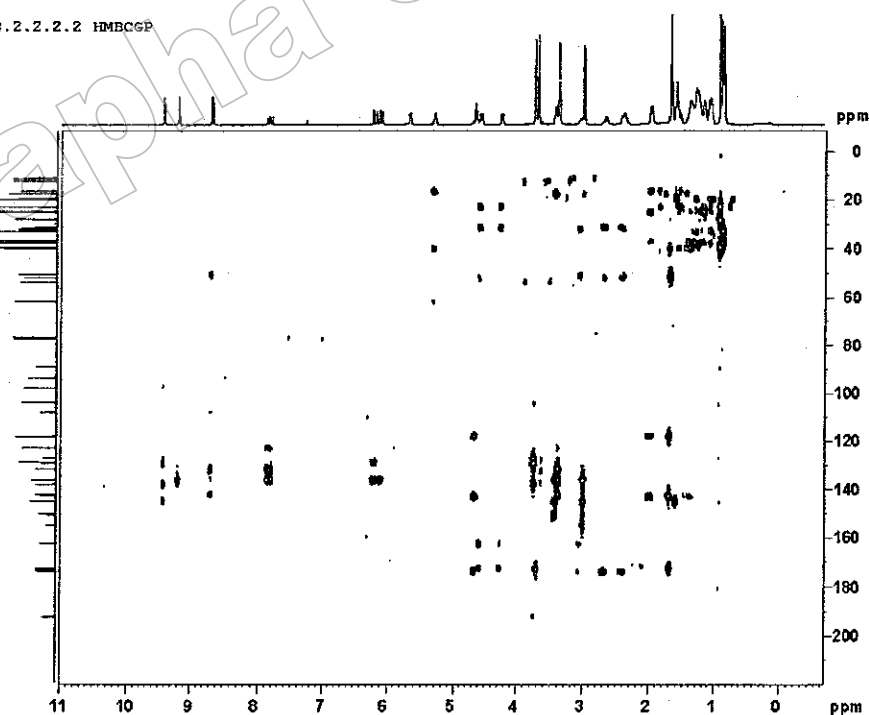
ภาพที่ 4-18 สเปกตรัม ^{13}C NMR, DEPT 90 และ DEPT 135 ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin a

46031 F4.3.2.2.2.2 HMQC
30/03/05



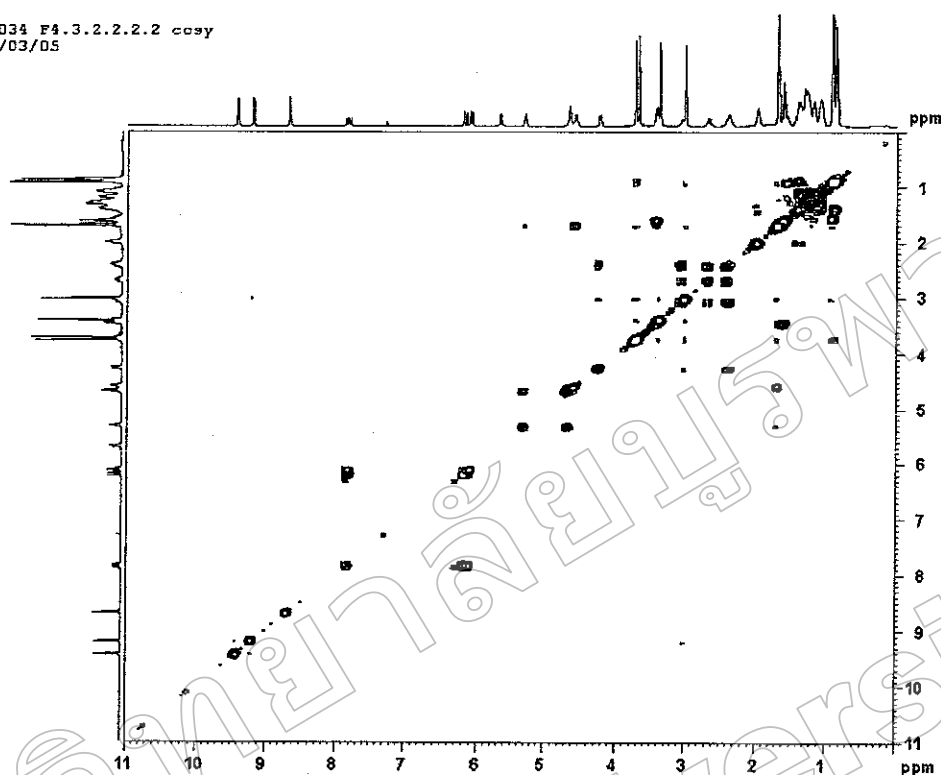
ภาพที่ 4-19 สเปกตรัม HMQC ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin a

46031 F4.3.2.2.2.2 HMBCGP
30/03/05



ภาพที่ 4-20 สเปกตรัม HMBC ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin a

46034 F1.3.2.2.2.2 cosy
30/03/05

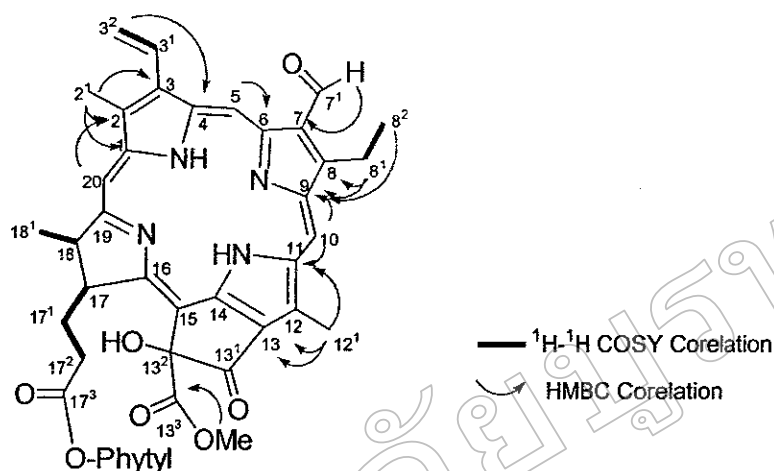


ภาพที่ 4-21 สเปกตรัม COSY ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin a

4. โครงสร้างของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b

โครงสร้างของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b ได้จากการวิเคราะห์ ^{13}C NMR (ภาพที่ 4-24) แสดงจำนวนสัญญาณทั้งหมด 55 สัญญาณ จากเทคนิค DEPT 90 และ 135 (ภาพที่ 4-24) แสดง Methyl Carbon 10 สัญญาณ Methylene Carbon 14 สัญญาณ Methine Carbon 11 สัญญาณ และ Quaternary Carbon 20 สัญญาณ นอกจากนี้สเปกตรัม ^{13}C NMR ยังแสดงสัญญาณของ sp^2 Carbon 26 สัญญาณ (4 สัญญาณ จากสัญญาณ sp^2 Carbon เป็น Carbonyl) จากนั้นหาความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMQC (ภาพที่ 4-25) ทำให้ทราบตำแหน่งโปรตอนของคาร์บอนแต่ละสัญญาณดังแสดงในตารางที่ 4-7 ^1H -NMR (ภาพที่ 4-23) และ ^{13}C NMR แสดงลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากโครงสร้าง 13^2 -Hydroxy Pheophytin a คือ มีสัญญาณของ Aldehyde ที่ Chemical Shift 11.10 , 187.7 ($\text{CH}-7'$)

จากเทคนิค ^1H - ^1H COSY (ภาพที่ 4-27), HMBC (ภาพที่ 4-26) และการเปรียบเทียบค่า Chemical Shift กับโครงสร้างที่เคยมีรายงาน (Nakatani, Ourisson, & Beck, 1981) ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของโครงสร้าง 13^2 -Hydroxy Pheophytin b ได้สำเร็จ ซึ่งมีค่า Chemical Shift ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ใกล้เคียงกับ 13^2 -Hydroxy Pheophytin a แตกต่างที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 คือ มีหมู่ Aldehyde ต่ออยู่ ซึ่งจากเทคนิค HMBC พบว่า $\text{H}-7'$ แสดงความสัมพันธ์กับ $\text{C}-7$ ดังแสดงในภาพที่



ภาพที่ 4-22 แสดงความสัมพันธ์โดย HMBC ของโครงสร้าง 13²-Hydroxy Pheophytin b

ตารางที่ 4-7 ข้อมูลจากการวิเคราะห์สเปกตรัม ¹³C, ¹H NMR, COSY และ HMBC ของ 13²-Hydroxy Pheophytin b ในส่วนของวง Porphyrin

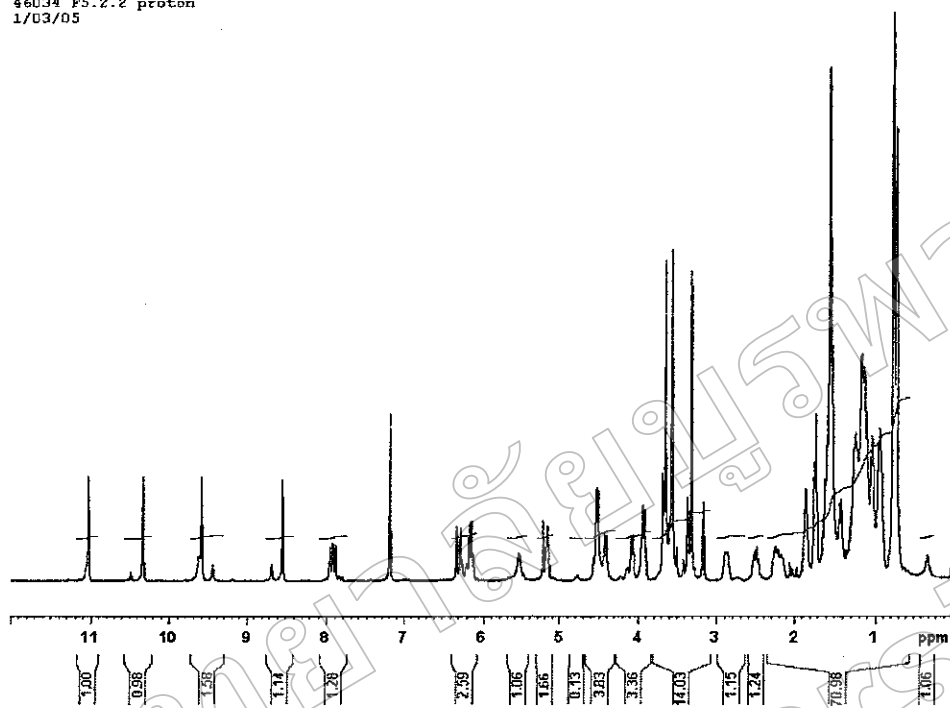
No		δ_c (ppm)	δ_H (ppm, $J=Hz$)	COSY	HMBC
1	C	142.9	-	-	-
2	C	132.7	-	-	-
2 ¹	CH ₃	12.1	3.32 s	-	C-2, C-3, C-4, C-1
3	C	133	-	-	-
3 ¹	CH	128.6	7.92 dd ($J=17.8, 11.7$)	H-3 ²	-
3 ²	CH ₂	123.7	6.16 d ($J=11.4$)	H-3 ¹	C-4
			6.30 d ($J=17.8$)	H-3 ¹	C-4
4	C	136.9	-	-	-
5	CH	102.1	10.33 s	-	C-6
6	C	137.8	-	-	-
7	C	150.9	-	-	-
7 ¹	-CHO	187.7	11.1 s	-	C-7
8	C	147.2	-	-	-
8 ¹	CH ₂	19.4	3.93 q	H-8 ²	C-8 ² , C-8, C-9
8 ²	CH ₃	19.1	1.61 m	H-8 ¹	C-9
9	C	159.3	-	-	-

ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

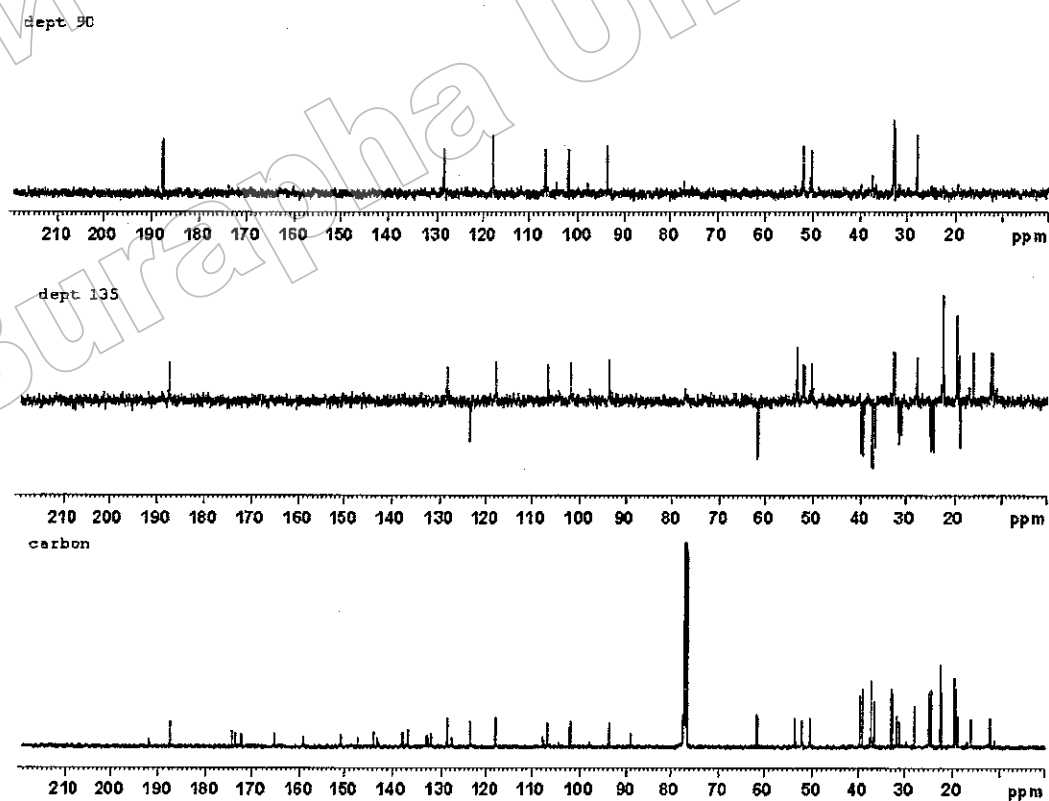
No		δ_c (ppm)	δ_H (ppm, J = Hz)	COSY	HMBC
10	CH	106.7	9.6 s	-	C-11, C-9
11	C	137.9	-	-	-
12	C	127.8	-	-	-
12 ¹	CH ₃	12.4	3.65 s	-	C-12, C13, C-11
13	C	132.1	-	-	-
13 ¹	C	192.	-	-	-
13 ²	C	88.8	--	-	-
	-OH	-	5.55 br s	-	-
13 ³	C	173.5	-	-	-
	-OCH ₃	53.5	3.57 s	-	C-13 ³
14	C	150.8	-	-	-
15	C	107.5	-	-	-
16	C	165.3	-	-	-
17	CH	52.1	4.08 d (J =8.9)	H-17 ¹	-
17 ¹	CH ₂	31.7	2.47 m	H-17 ² , H-17	-
17 ²	CH ₂	31.2	2.68 m	H-17 ¹	-
			3.01 m	H-17 ¹	-
17 ³	C	174.3	-	-	-
18	CH	50.4	4.41 d (J =7.0)	H-18 ¹	-
18 ¹	CH ₃	22.7	1.68 s	H-18	-
19	C	174.5	-	-	-
20	CH	93.9	8.54 s	-	C-2

หมายเหตุ ค่า Chemical Shift ในส่วนของวง Phytol ของ 13²-Hydroxy Pheophytin b มีค่าไม่แตกต่างกับ 13²-Hydroxy Pheophytin a จึงไม่ได้นำมาแสดงในตารางที่ 4-7

#6034 F5.2.2 proton
1/03/05

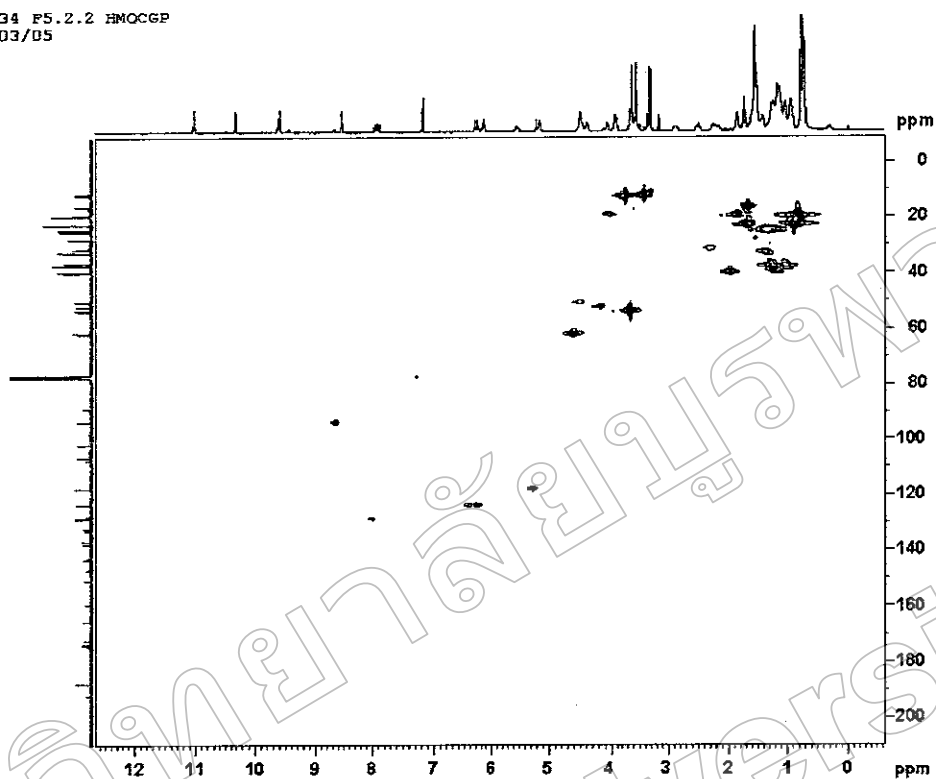


ภาพที่ 4-23 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b



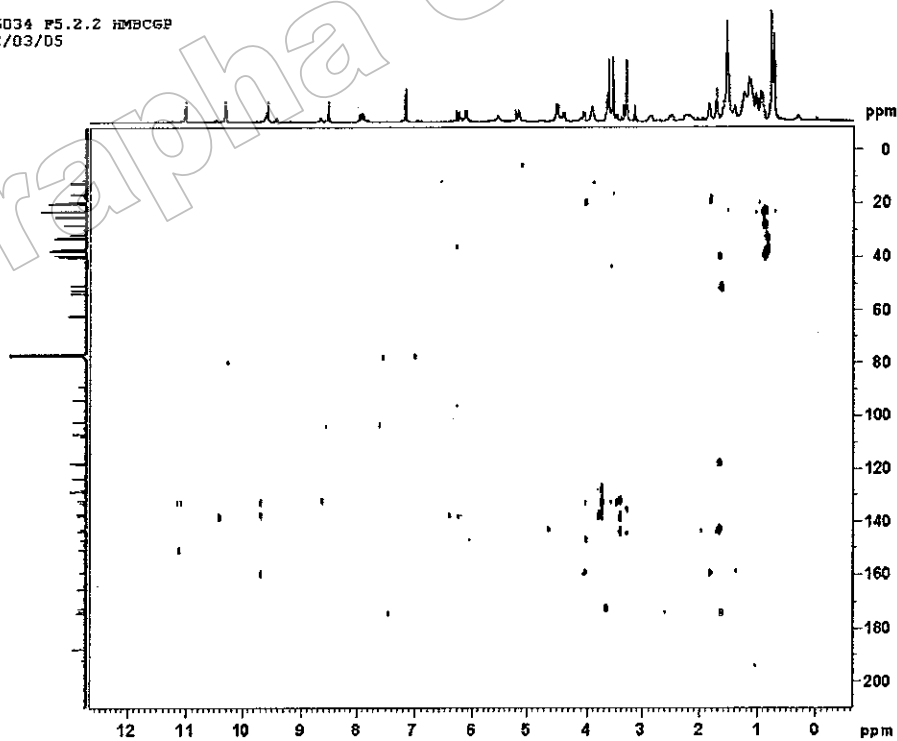
ภาพที่ 4-24 สเปกตรัม ^{13}C NMR, DEPT 135 และ DEPT 90 ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b

46034 F5.2.2 HMQCP
02/03/05

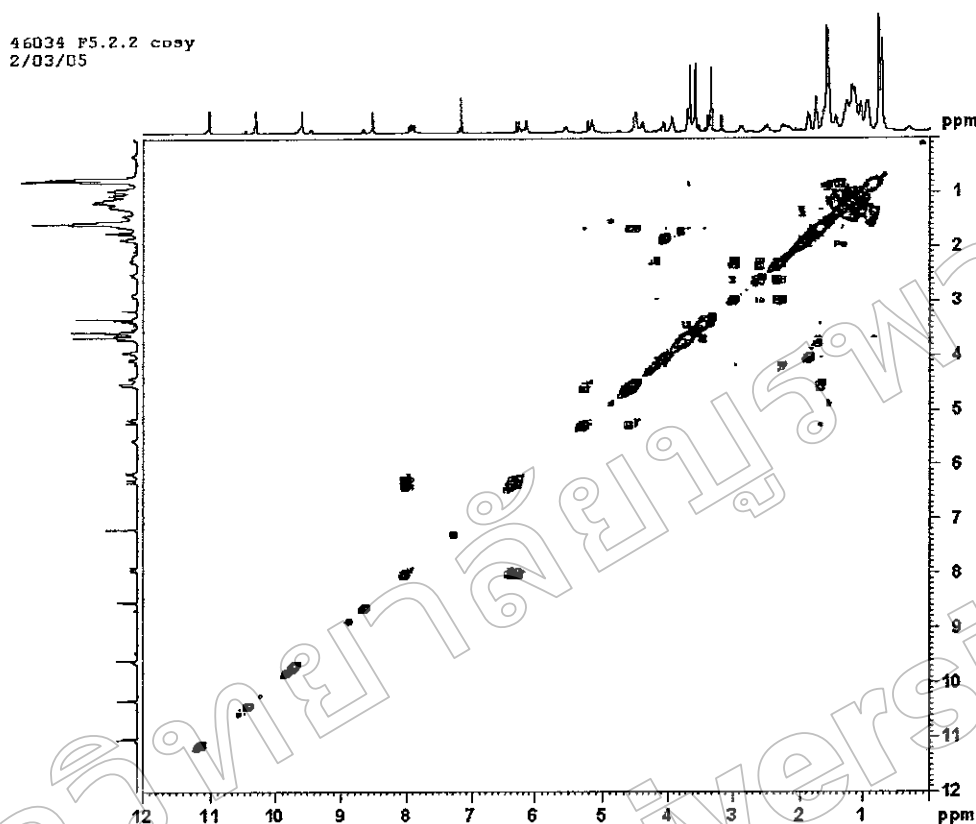


ภาพที่ 4-25 สเปกตรัม HMQC ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b

46034 F5.2.2 HMBGP
02/03/05



ภาพที่ 4-26 สเปกตรัม HMBC ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b



ภาพที่ 4-27 สเปกตรัม COSY ของ 13^2 -Hydroxy Pheophytin b

5. โครงสร้างของ 4,18-Dihydroxydictyolactone

4,18-Dihydroxydictyolactone แสดงการหมุนระนาบแสงโพลาไรส์ $[\alpha]_D^{20} -9^\circ$

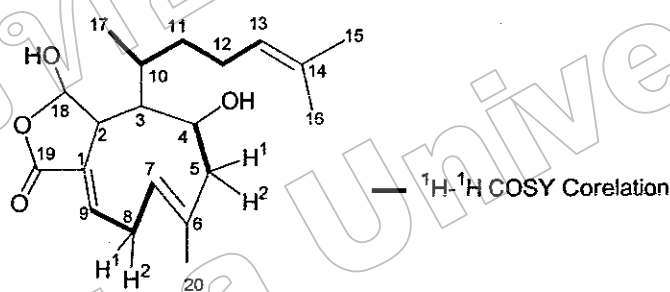
(c 1.50×10^{-2} M, CH_2Cl_2); UV (c 6.11×10^{-4} M, CH_2Cl_2) $\lambda_{\text{max}} = 236$ nm ($\epsilon 5163$); IR (CH_2Cl_2):

$\nu_{\text{max}} = 3440, 3045, 2923, 1739, 1644, 1451, 1376$ cm^{-1} ; HR ESIMS $m/z = 357.2045$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

(Calcd $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{Na}$; 357.2036) ได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$ ซึ่งมีค่าความไม่อิ่มตัวเท่ากับ 6

ผลการวิเคราะห์สเปกตรัม ^{13}C NMR (ภาพที่ 4-33) แสดงจำนวนสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 20 สัญญาณ จากเทคนิค DEPT 90 และ DEPT 135 (ภาพที่ 4-33) ทำให้ทราบชนิดคาร์บอนแต่ละสัญญาณ คือ Methyl 4 สัญญาณ Methylene 4 สัญญาณ Methine 8 สัญญาณ และ Quaternary 4 สัญญาณ จากสัญญาณ ^{13}C NMR มี 6 สัญญาณที่ δ 133.9 (C-1), 141.8 (C-9), 136.3 (C-6), 125.2 (C-7), 123.8 (C-13) และ 132.0 (C-14) เป็น sp^2 Carbon และ 1 สัญญาณ ที่ δ 172.5 (C-19) เป็นหมู่ Carbonyl จากค่าความไม่อิ่มตัว และจำนวนพันธะคู่ 4 พันธะ แสดงว่าโครงสร้างเป็นแบบ Bicyclic Diterpene

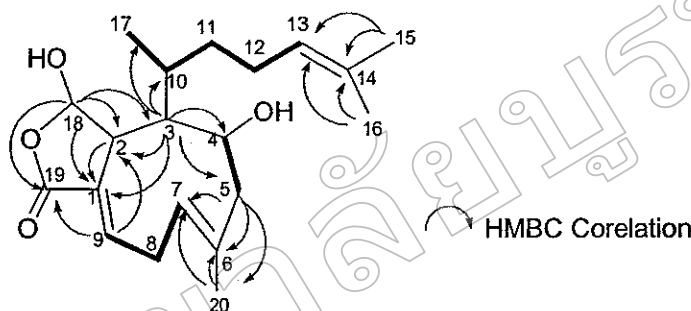
สเปกตรัม HMQC (ภาพที่ 4-34) ทำให้ทราบตำแหน่งของโปรตอนแต่ละสัญญาณของคาร์บอนแต่ละตัว (ดังแสดงในตารางที่ 4-8) $^1\text{H-NMR}$ (ภาพที่ 4-32) แสดง Methyl Singlet 3 สัญญาณ ที่ δ 1.93 (3H-20), 1.56 (3H-15) และ 1.66 (3H-16) Methyl Doublet 1 สัญญาณที่ δ 1.07 (3H-17) เมื่อพิจารณาสัญญาณที่ δ 72.6, 4.32 dd, $J = 4.2, 2.0$ Hz (CH-4) และที่ δ 98.1, 5.88 s (CH-18) เป็น sp^3 Methine Carbon ที่มีค่า Chemical Shift สูง เป็นผลมาจากมีหมู่ Hydroxy มาต่ออยู่ที่ C-4 และ C-18 นอกจากนี้ C-18 ยังต่อกับหมู่ Ester Lactone ด้วยเนื่องจากเกิด Deshield มาก นอกจากนี้ยังมีสัญญาณของ Geminal Proton ที่ δ 2.18 dd, $J = 12.1, 4.2$ Hz (H^1 -5), 2.36 d, $J = 12.7$ Hz (H^2 -5), 2.97 ddd, $J = 17.5, 7.1, 4.8$ Hz (H^1 -8) และ 3.24 ddt, $J = 17.5, 11.4, 2.0$ Hz (H^2 -8) จากนั้นหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลจาก ^1H - ^1H COSY (ภาพที่ 4-36) ได้ความสัมพันธ์ 3 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง (H-4 แสดงกับ H-5) ส่วนที่สอง (H-8 แสดงกับ H-7 และ H-9) ส่วนที่สาม (H-10 แสดงกับ H-17 และ H-11, H-12 แสดงกับ H-11 และ H-13) ดังแสดงความสัมพันธ์ในภาพที่ 4-28



ภาพที่ 4-28 แสดงความสัมพันธ์ของ ^1H - ^1H COSY ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone

จากนั้นเชื่อมต่อโครงสร้างแต่ละส่วนด้วยความสัมพันธ์ของ HMBC (ภาพที่ 4-35) พบว่า ส่วนที่หนึ่ง (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5) ต่อกับ ส่วนที่สอง (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7) โดยผ่าน sp^2 Quaternary Carbon (C-6) ที่มี Methyl (CH_3 -20) เชื่อมต่ออยู่ จากความสัมพันธ์ คือ H-20 แสดงกับ C-6 และ C-7, H^1 -5 และ H^2 -5 แสดงกับ C-6, C-20 และ C-7 พิจารณาส่งส่วนที่สาม (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 13) จากความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMBC พบว่าคู่พันธะของ C-13 คือ sp^2 Quaternary Carbon (C-14) ซึ่งมีหมู่ Methyl (CH_3 -15, 16) สองหมู่มาต่ออยู่ จากความสัมพันธ์คือ H-15 และ H-16 ทั้งคู่แสดงกับ C-14 และ C-13 พิจารณาส่งส่วนที่หนึ่ง (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4) พบว่าต่อกับส่วนที่สาม (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 10) โดยผ่าน sp^3 Methine Carbon (C-3) โดยพบว่า H-3 แสดงกับ C-4, C-5, C-10, C-17 นอกจากนี้ H-3 ยังแสดงความสัมพันธ์กับ C-2 และ C-1 เมื่อพิจารณาส่วนที่สอง (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9) พบว่าคู่พันธะของ C-9 คือ C-1 จากความสัมพันธ์คือ H-9 แสดงกับ sp^3

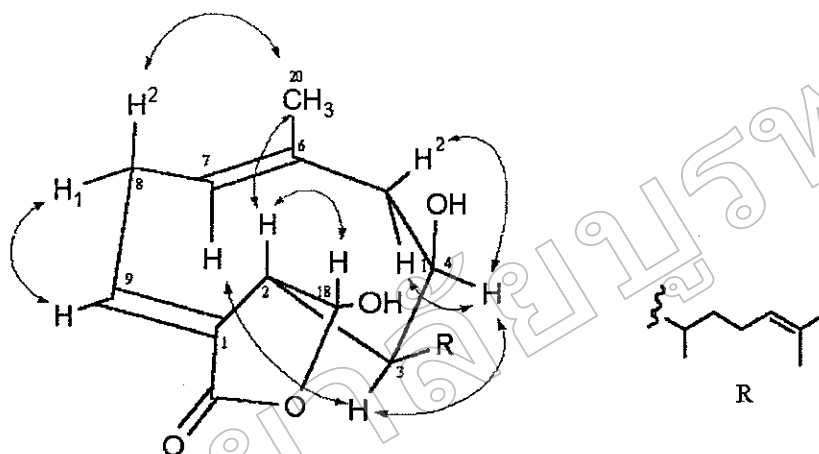
Methine Carbon (C-2) และยืนยันหมู่พันธะดังกล่าวจากความสัมพันธ์คือ H-2 แสดงกับ C-1 จากความสัมพันธ์นี้จึงได้โครงสร้างที่เป็นวงเก้าเหลี่ยม นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างที่เป็นวงเก้าเหลี่ยมเชื่อมต่อกับวงห้าเหลี่ยม ที่ C-1 และ C-2 จากความสัมพันธ์คือ H-18 แสดงกับ C-2, C-1, C-3 และ C-19 (C=O) และอีกจุดหนึ่งคือ H-9 แสดงกับ C-19 (C=O) ดังแสดงความสัมพันธ์ HMBC ในภาพที่ 4-29



ภาพที่ 4-29 แสดงความสัมพันธ์ของ HMBC ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone

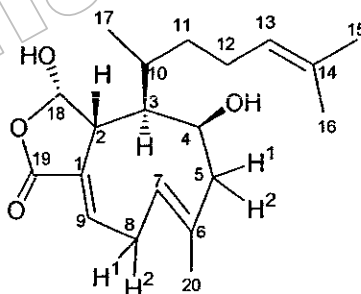
นอกจากนี้โครงสร้างที่ได้พบว่ามี Chiral Carbon 5 ตำแหน่ง ที่ C-2, C-3, C-4, C-10 และ C-18 จากนั้นศึกษา Stereochemistry โดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับ Dictyolactone ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดย X-Ray Crystallography มี Relative Stereochemistry เป็น $2R^*$, $3R^*$ และ $10S^*$ (Finer et al., 1979) ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ช่วยยืนยัน Stereochemistry ที่ C-2 เป็น R^* และ C-3 เป็น R^* จากเทคนิค NOESY (ภาพที่ 4-37) และ NOE Difference (ภาพที่ 4-38 และ 4-39) พบว่า H-2 ไม่แสดงความสัมพันธ์กับ H-3 แต่มีผลทำให้สัญญาณ 3H-20 (6.9%) สูงขึ้น ส่วน H-7 (6.4%) มีสัญญาณสูงขึ้นเมื่อทำ NOE Difference ที่ H-3 ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการ NOE Difference ตรงกับที่มีรายงานใน โครงสร้างของ 4-Acetoxydictyolactone (Ishitsuka et al., 1988) นอกจากนี้ยังพบว่า โครงสร้างที่ได้แตกต่างจากที่มีรายงาน ตรงที่มี Chiral Carbon เพิ่มอีก 2 ตำแหน่ง ที่ C-4 และ C-18 จากการวิเคราะห์พบว่า C-4 มี Configuration เป็น S^* เนื่องจาก Irradiate H-4 (ภาพที่ 4-40) มีผลทำให้ H-3 (2.4%), H¹-5 (3.4%), H²-5 (2.5%) และ H-17 (6.0%) มีสัญญาณสูงขึ้น นอกจากนี้ทั้งสองเทคนิค H-4 ไม่แสดงความสัมพันธ์กับ H-2 และหา Stereochemistry ที่ C-18 โดย Irradiated H-18 (ภาพที่ 4-41) มีผลทำให้สัญญาณ H-2 (2.4%), H-10 (8.2%) และ H-17 (6.8%) สูงขึ้นโดยไม่ให้สัญญาณของ H-3 จึงได้ Configuration ที่ C-18 เป็น S^* ส่วน Chiral Carbon (C-10) ไม่สามารถหาได้เนื่องจาก Irradiated ที่ H-17 (ภาพที่ 4-42) ทำให้สัญญาณ H-4 (1.7%) และ H-18 (2.0%) สูงขึ้น จากเทคนิค NOESY ยังพบว่า H-18 แสดงความสัมพันธ์ทั้ง H-10 และ H-17 ส่วนพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-7 มี Configuration แบบ E จากการวิเคราะห์โดย Irradiate ที่ H-20 (ภาพที่ 4-43) พบว่า

แสดงกับ H^2-8 (0.7%) และ $H-2$ (1.5%) แต่ไม่ให้สัญญาณของ $H-7$ และพันธะคู่ที่ $C-9$ และ $C-1$ มี Configuration แบบ *E* จากการ Irradiate $H-9$ (ภาพที่ 4-44) พบว่าแสดงกับ H^1-8 (5.7%) แต่ไม่ให้สัญญาณของ $H-2$ ดังแสดงความสัมพันธ์ NOE Difference ในภาพที่ 4-30



ภาพที่ 4-30 แสดงความสัมพันธ์ NOE Difference ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone

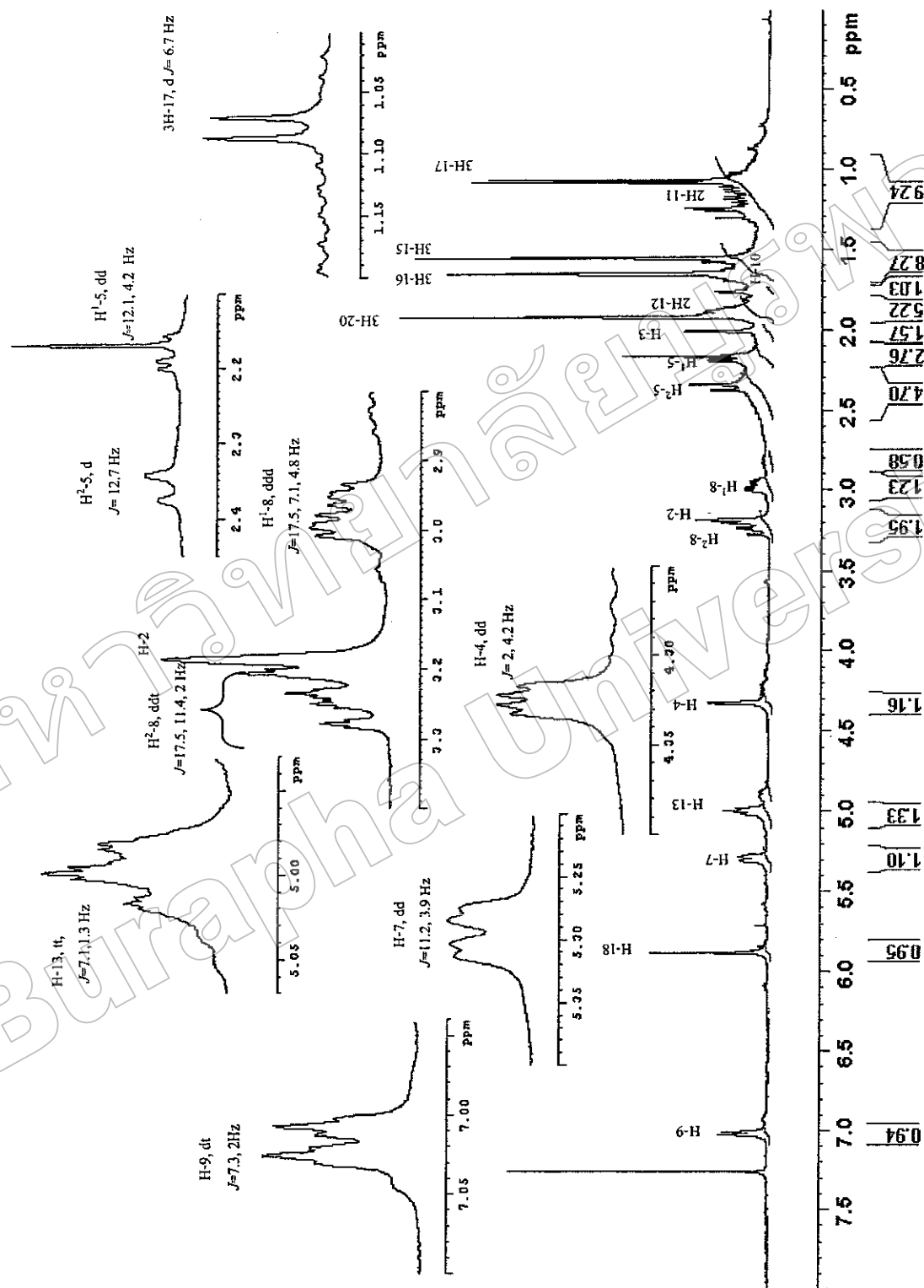
จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคดังกล่าวจึงได้โครงสร้างที่มี Relative Stereochemistry เป็น $(2R^*,3R^*,4S^*,6E,9E,18S^*)$ -4,18-Dihydroxydictyolactone ดังภาพที่ 4-31



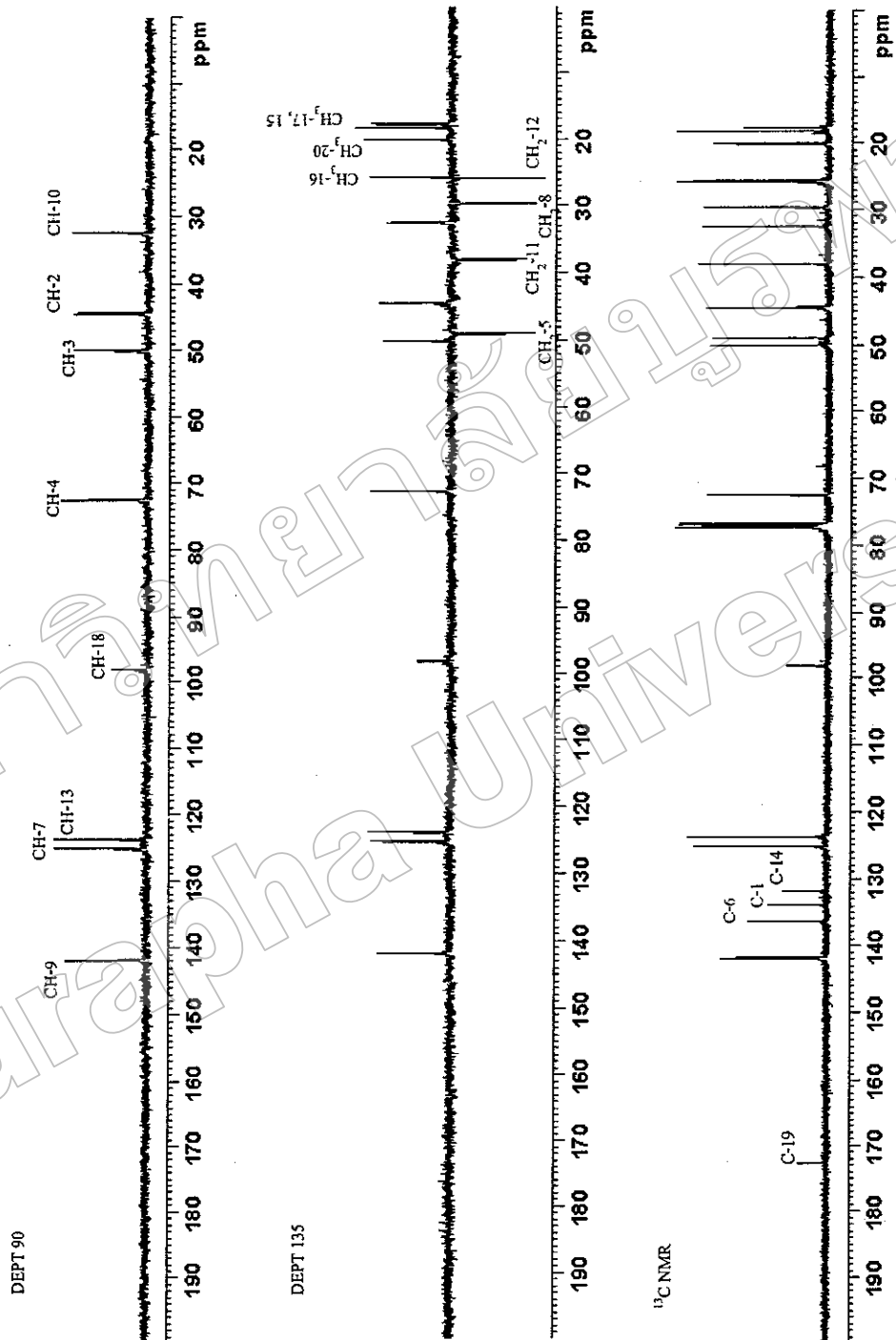
ภาพที่ 4-31 แสดงโครงสร้างที่มี Relative Stereochemistry ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone

ตารางที่ 4-8 ข้อมูลจากการวิเคราะห์สเปกตรัม ^{13}C , ^1H NMR, COSY, HMBC และ NOESY
ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone

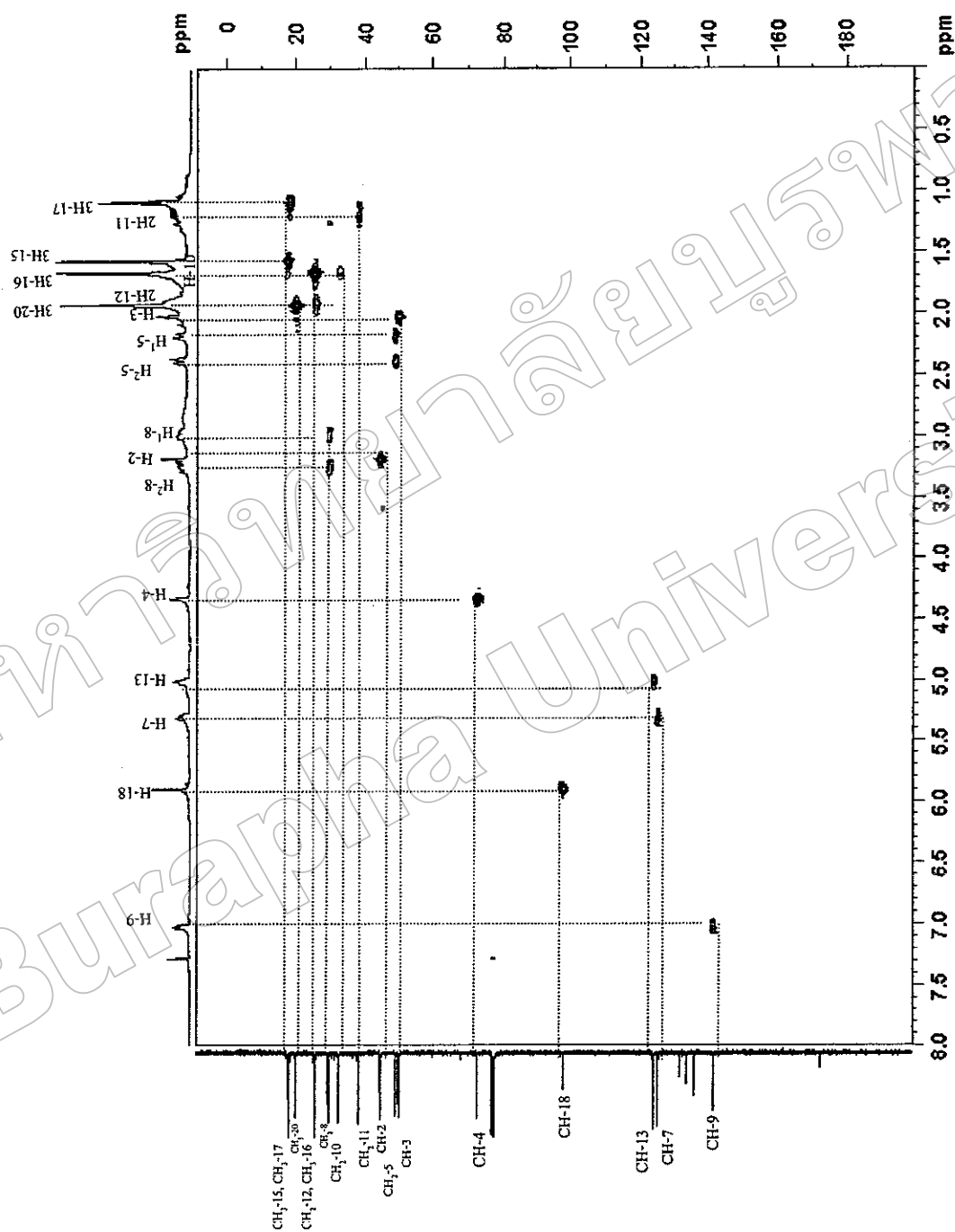
No		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, $J=\text{Hz}$)	COSY	HMBC	NOESY
1	C	133.9	-	-	-	-
2	CH	44.4	3.19 br s	-	C-1, C-3, C-4, C-10, C-18, C-19	H-18
3	CH	50.1	2.01 br s	-	C-1, C-2, C-4, C-5, C-10, C-11, C-17, C-18	H-7, H-4
4	CH	72.6	4.32 dd ($J=4.2, 2$)	$\text{H}^1\text{-5}, \text{H}^2\text{-5}$	C-2, C-6	H-17, $\text{H}^1\text{-5}, \text{H}^2\text{-5}, \text{H-3}$
5	CH_2	49.0	H^1 2.18 dd ($J=12.1, 4.2$) H^2 2.36 d ($J=12.7$)	$\text{H}^2\text{-5}, \text{H-4}$ $\text{H}^1\text{-5}, \text{H-4}$	C-20 C-3, C-4, C-6, C-7	H-4, H-7 H-4
6	C	136.3	-	-	-	-
7	CH	125.2	5.30 dd ($J=11.2, 3.9$)	$\text{H}^1\text{-8}, \text{H}^2\text{-8}$	-	$\text{H}^1\text{-8}, \text{H-3}, \text{H}^1\text{-5}$
8	CH_2	29.6	H^1 2.97 ddd ($J=17.5, 7.1, 4.8$) H^2 3.24 ddt ($J=17.5, 11.4, 2.0$)	$\text{H}^2\text{-8}, \text{H-7}, \text{H-9}$ $\text{H}^1\text{-8}, \text{H-7}, \text{H-9}$	-	H-7, H-9 H-9
9	CH	141.8	7.01 dt ($J=7.3, 2.0$)	$\text{H}^1\text{-8}, \text{H}^2\text{-8}$	C-2, C-7, C-8, C-19	$\text{H}^1\text{-8}, \text{H}^2\text{-8}$
10	CH	32.5	1.59 M	H-17, H-11	C-17	H-18
11	CH_2	38.1	1.21 M	H-10, H-12	C-3, C-10, C-12, C-13, C-17	-
12	CH_2	25.8	1.88 M	H-11, H-13	C-13	-
13	CH	123.8	5.00 tt ($J=7.1, 1.3$)	H-12	C-12, C-15, C-16	-
14	C	132.0	-	-	-	-
15	CH_3	17.7	1.56 S	-	C-13, C-14, C-16	-
16	CH_3	25.6	1.66 S	-	C-13, C-14, C-15	-
17	CH_3	18.2	1.08 d ($J=6.7$)	H-10, H-16	C-11, C-10, C-3	H-18, H-4
18	CH	98.0	5.88 br s	-	C-19, C-1, C-2, C-3	H-17, H-2, H-10
19	C	172.5	-	-	-	-
20	CH_3	20.1	1.93 S	-	C-5, C-6, C-7	-



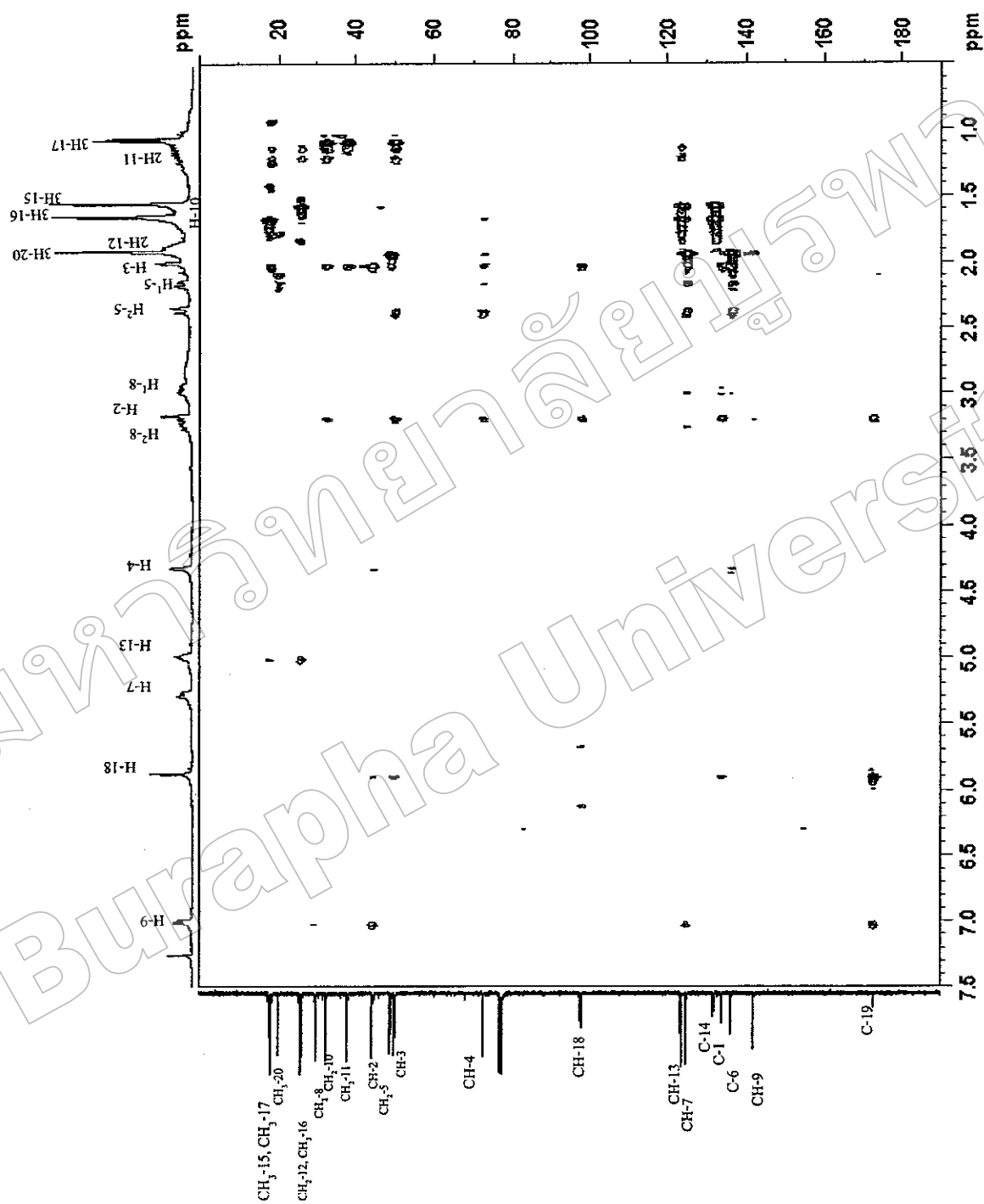
ภาพที่ 4-32 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone



ภาพที่ 4-33 สเปกตรัม ^{13}C NMR, DEPT 135 และ DEPT 90 ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone



ภาพที่ 4-34 สเปกตรัม HMQC ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone



ภาพที่ 4-35 สเปกตรัม HMBC ของ 4,18-Dihydroxydictyolactone