

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การสกัดแยก andrographolide

##### 4.1.1 การเตรียมสารสกัดอย่างหยาบ ethanol

Andrographolide ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม diterpene lactones จะถูกสกัดจากต้นฟ้าทะลายโจรโดยใช้ ethanol นำน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethanol มาตรวจลอบว่ามี andrographolide และ neoandrographolide เป็นองค์ประกอบหรือไม่ ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>, DVS: chloroform : absolute ethanol = 85:15) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) และค่า hR<sub>f</sub> ของ neoandrographolide จาก Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. 1, 1995: 30) เนื่องจากยังไม่มีสารมาตรฐานหรือสารสังเคราะห์ neoandrographolide จำหน่าย จึงต้องอาศัยข้อมูลจากเอกสารในการอ้างอิงก่อน พบว่าน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethanol มี andrographolide และ neoandrographolide เป็นองค์ประกอบ โดยพบ spot ของ andrographolide ซึ่ง quenching ภายใต้แสง UV 254 nm จากนั้นสเปรย์ด้วย Kedde reagent จะได้ spot ของ andrographolide และ neoandrographolide สีม่วงเข้ม (dark violet) ค่า hR<sub>f</sub> ของ andrographolide และ neoandrographolide เท่ากับ 52 และ 30 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 1, รูปที่ 2)

##### 4.1.2 การเตรียมน้ำยาสกัด ethyl acetate

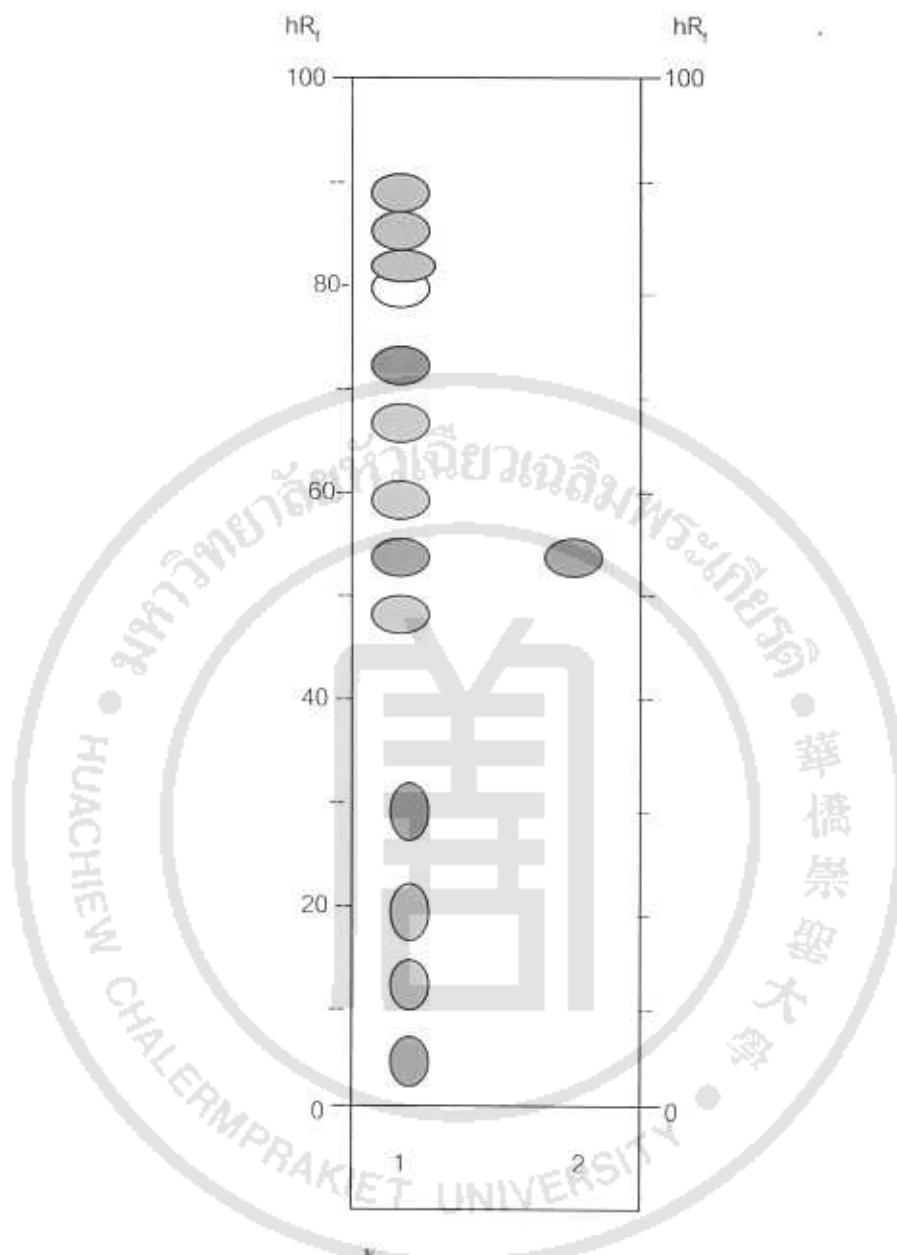
นำน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethanol (จากข้อ 4.1.1) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำและนำไป partition ด้วย hexane และ ethyl acetate พบว่ามี andrographolide และ neoandrographolide อยู่ในชั้นของ ethyl acetate โดยการตรวจลอบด้วย Thin Layer Chromatography (TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>, DVS: chloroform : absolute ethanol = 85:15) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) และค่า hR<sub>f</sub> ของ neoandrographolide จาก Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. 1, 1995: 30) พบว่า andrographolide จะ quenching ภายใต้แสง UV 254 nm จากนั้นสเปรย์ด้วย Kedde reagent จะได้ spot ของ andrographolide และ neoandrographolide สีม่วงเข้ม (dark violet) ค่า hR<sub>f</sub> ของ andrographolide และ neoandrographolide เท่ากับ 54 และ 30 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 2, รูปที่ 3)

ตารางที่ 1 ค่า  $R_f$  ขององค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethanol

Spot	$R_f$	การตรวจสอบ	
		UV 254 nm	3,5-Dinitrobenzoic acid/Potassium hydroxide in methanol (colour)
1	6	-	ม่วงเข้ม (dark violet)
2	12	quenching	ม่วง (violet)
3	18	quenching	ม่วง (violet)
4*	30	-	ม่วงเข้ม (dark violet)
5	49	-	ม่วง (violet)
6*	52	quenching	ม่วงเข้ม (dark violet)
7	59	quenching	ม่วง (violet)
8	67	-	ม่วง (violet)
9	72	quenching	ม่วงเข้ม (dark violet)
10	79	-	เหลือง
11	83	-	เขียว
12	85	-	เขียว
13	87	-	เขียว

\* = neoandrographolide

\* = andrographolide



รูปที่ 2 Thin-layer chromatogram ของน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethanol จากต้นฟ้าทะลายโจร  
(1)เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

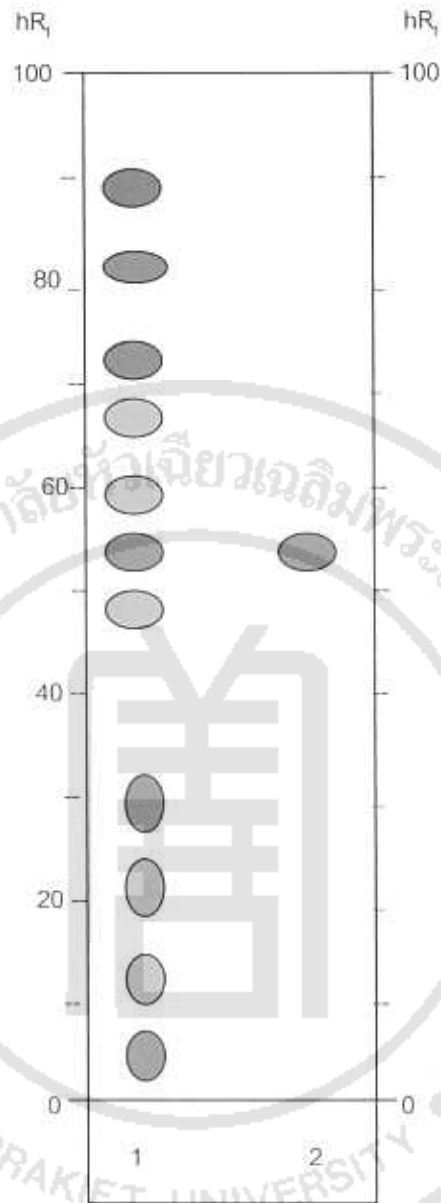
TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>  
 Developing solvent: chloroform : absolute ethanol = 85:15  
 Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid/Potassium hydroxide in methanol

ตารางที่ 2 ค่า  $R_f$  ขององค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยาสกัด ethyl acetate

Spot	$R_f$	การตรวจสอบ	
		UV 254 nm	3,5-Dinitrobenzoic acid/Potassium hydroxide in methanol (colour)
1	6	-	ม่วงเข้ม (dark violet)
2	12	quenching	ม่วง (violet)
3	18	quenching	ม่วง (violet)
4*	30	-	ม่วงเข้ม (dark violet)
5	49	-	ม่วง (violet)
6*	54	quenching	ม่วงเข้ม (dark violet)
7	59	quenching	ม่วง (violet)
8	67	-	ม่วง (violet)
9	72	quenching	ม่วงเข้ม (dark violet)
10	83	-	ซีขาว
11	87	-	ซีขาว

4\* = neoandrographolide

6\* = andrographolide



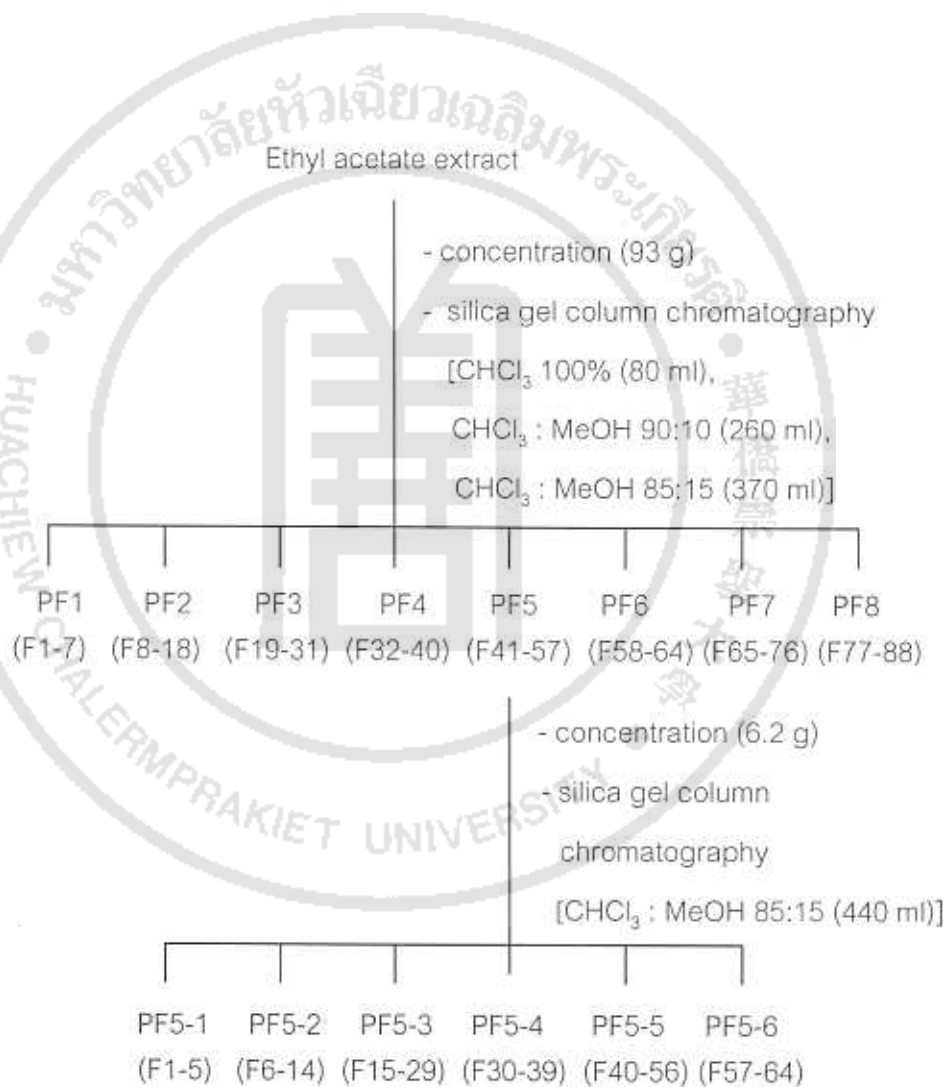
รูปที่ 3 Thin-layer chromatogram ของน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethyl acetate จากต้นฟ้าทะลายโจร

(1) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

TLC plate:	silica gel GF <sub>254</sub>
Developing solvent:	chloroform : absolute ethanol = 85:15
Detection:	3,5-Dinitrobenzoic acid/Potassium hydroxide in methanol

#### 4.1.3 การแยก andrographolide

นำน้ำยาสกัด ethyl acetate (93 กรัม, จากข้อ 4.1.2) มาแยกสารเจือปนอื่นๆ ออกไป ด้วยวิธี column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.5 ซม. ความยาว 90 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ใน chloroform (สูงประมาณ 78 ซม.) จากนั้นค่อยๆ เพิ่มความมีขั้ว (polarity) ของสารละลายโดยใช้ methanol จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายผสม chloroform : methanol = 85 :15 (รูปที่ 4, การเพิ่มความมีขั้วของ solvent system จะกระทำเมื่อ TLC fingerprint



รูปที่ 4 แผนผังแสดงการแยก andrographolide จากองค์ประกอบอื่นๆ ในน้ำยาสกัด ethyl acetate

ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นให้สารที่มีขั้วสูงถูกชะออกมา) เก็บ fraction (~8 ml) โดยใช้ fraction collector ตรวจสอบว่ามี andrographolide ใน fraction ใดด้วยวิธี TLC (TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>, DVS; chloroform : absolute ethanol = 85:15) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) รวม fractions ที่มี TLC profiles คล้ายคลึงกัน (เช่น PF1 (รูปที่ 5) มาจากการรวม fractions 1 - 7 ซึ่งมี TLC profiles คล้ายคลึงกัน เป็นต้น)

นำ fraction PF5 (6.2 g) ซึ่งมี andrographolide เป็นองค์ประกอบมากที่สุด (รูปที่ 5) มาแยกสารเจือปนอื่นๆ ออกไปด้วยวิธี column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภาชนะนอก 2.5 ซม. ความยาว 70 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 (สูงประมาณ 60 ซม.) ในสารละลายผสม chloroform : methanol = 85:15 เก็บ fraction (~6 ml) โดยใช้ fraction collector ตรวจสอบว่ามี andrographolide ใน fraction ใดด้วยวิธี TLC (TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>, DVS; chloroform : methanol = 85:15) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (รูปที่ 6) รวม fractions ที่มี TLC profiles คล้ายคลึงกัน (เช่น PF5-1 มาจากการรวม fractions 1-5 ซึ่งมี TLC profiles คล้ายคลึงกัน เป็นต้น)

นำ andrographolide fraction ที่แยกได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ (PF5-5) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการตกผลึกซ้ำหลายๆ ครั้งด้วย methanol จนได้ผลึกสีขาวรูป plate (164 mg)

#### 4.1.4 การตรวจเอกลักษณ์ andrographolide

นำผลึก andrographolide ที่แยกได้ ไปตรวจเอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) ด้วยวิธี

4.1.4.1 วัด melting point (m.p.) ด้วยเครื่อง Melting point apparatus (Electrothermal IA 9200, USA)

: m.p. ของสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) = 230-231°C

: m.p. ของผลึก andrographolide ที่แยกได้ = 230-231°C

4.1.4.2 วัดการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่อง UV / VIS Spectrophotometer (Jasco V-530) (รูปที่ 7)

:  $UV_{max}$  ของสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) ใน methanol = 222 nm

:  $UV_{max}$  ของผลึก andrographolide ที่แยกได้ใน methanol = 222 nm

4.1.4.3 Thin Layer Chromatography (TLC) บนแผ่น silica gel GF<sub>254</sub> ใช้ Developing Solvent System (DVS) 3 ระบบดังนี้

A. chloroform : absolute ethanol = 85 : 15

B. acetone : methanol = 90:10

C. n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80

จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm และสเปร์ย์ด้วย Kedde reagent

พบว่าทุก systems มี spot เดียว และมี  $R_f$  value เท่ากับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) คือ 54, 21 และ 44 ตามลำดับ (รูปที่ 8-10)

4.1.4.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) โดยใช้สภาวะดังนี้

Column : Reversed Phases-18, Luna® (10  $\mu$ m),  
4.6 mm I.D. x 25 cm.

Mobile Phase : 1. MeOH : H<sub>2</sub>O = 80 : 20  
2. MeOH : H<sub>2</sub>O = 70 : 30  
3. MeOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 40

Internal standard : propyl paraben

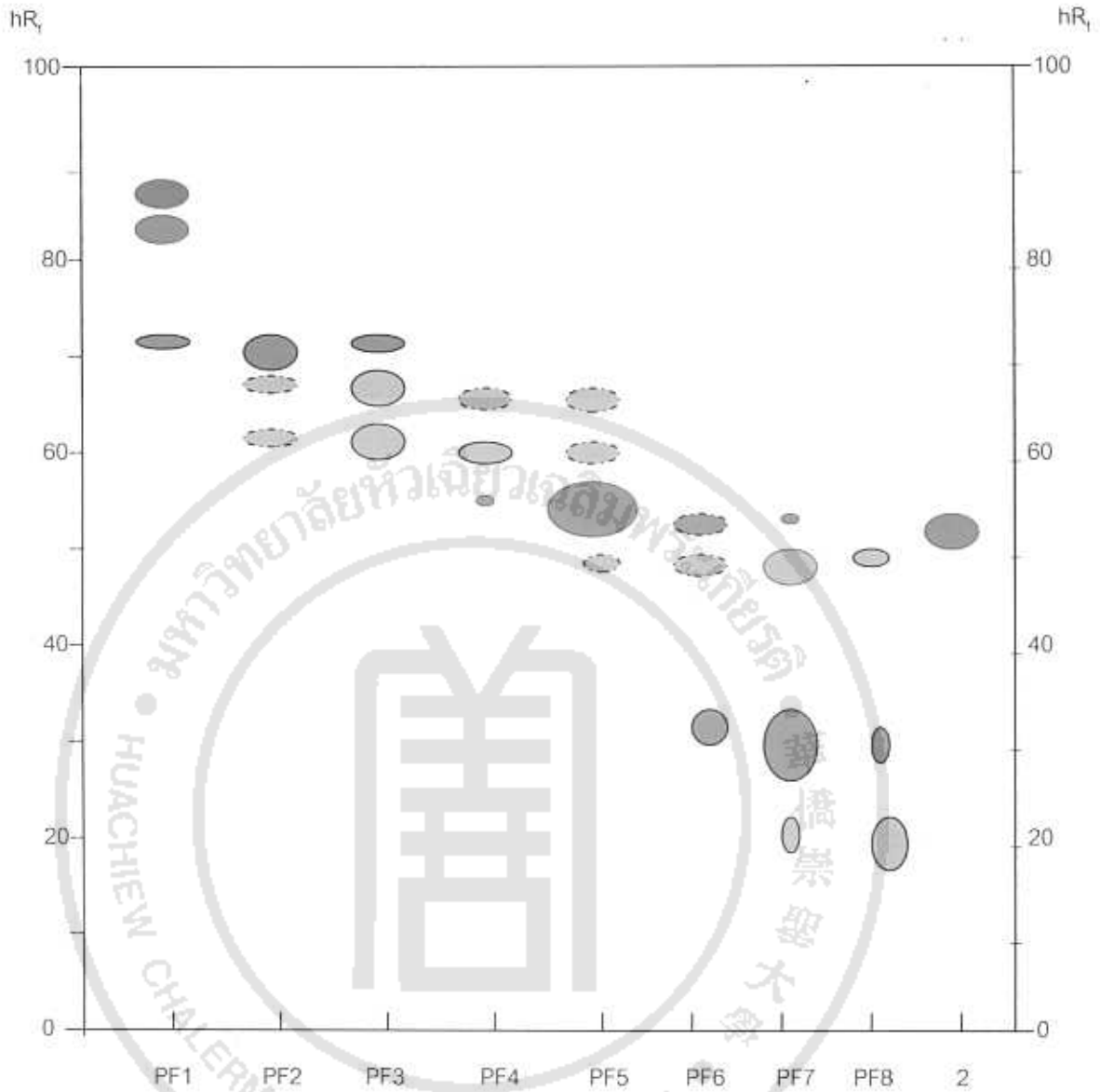
Flow rate : 1 ml/min

Detector : 255 nm

พบว่าในทุกๆ สภาวะ ผลึก andrographolide ที่แยกได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ (รูปที่ 11-13) และเมื่อเปรียบเทียบ retention time กับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) พบว่ามี retention time ที่ใกล้เคียงกันในทุกๆ systems ดังนี้

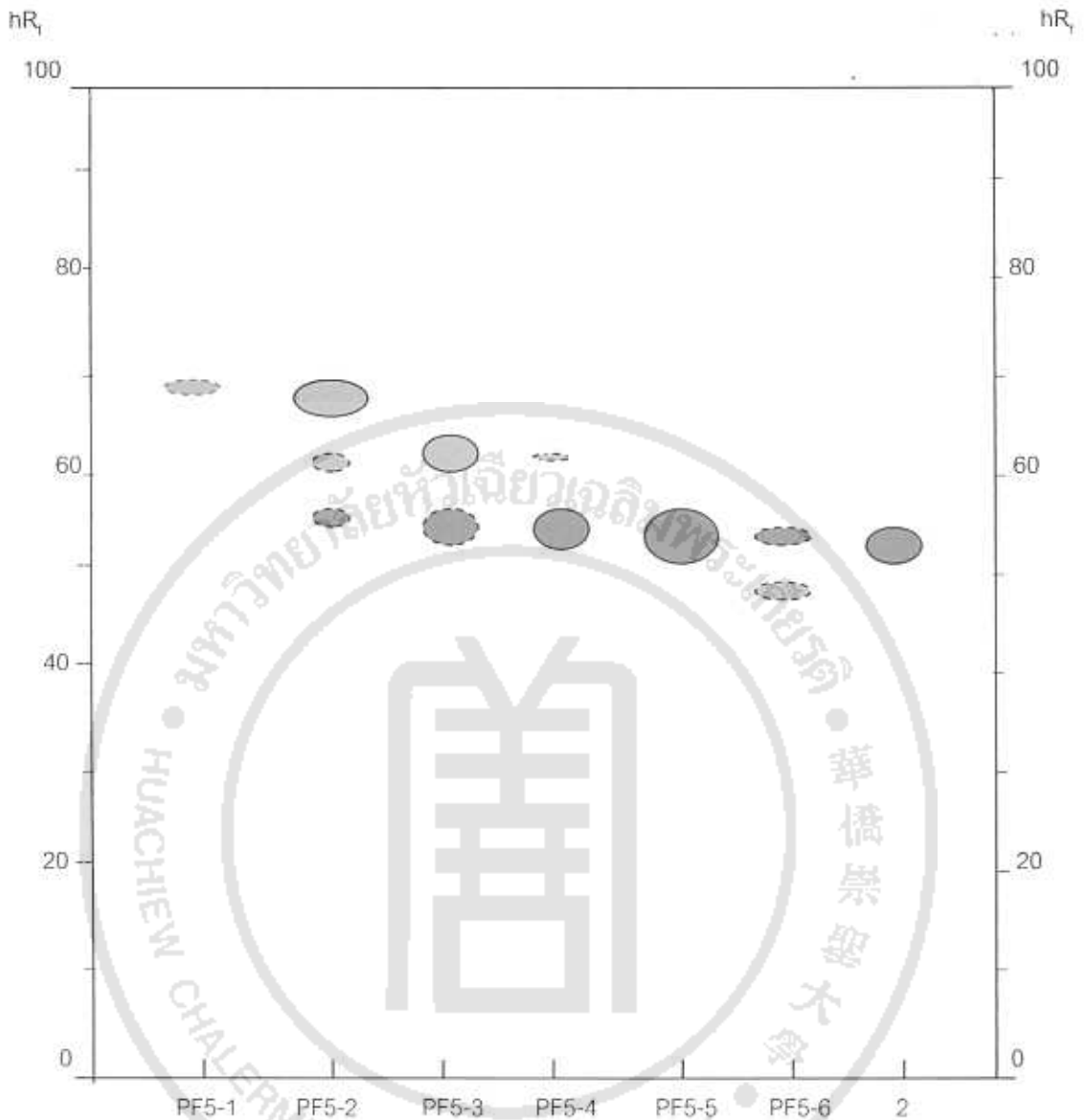
Mobile Phase	Retention time	
	สารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®)/ propyl paraben	andrographolide ที่แยกได้/ propyl paraben
MeOH : H <sub>2</sub> O = 80 : 20	3.134/4.246	3.133/4.225
MeOH : H <sub>2</sub> O = 70 : 30	3.939/6.459	3.951/6.484
MeOH : H <sub>2</sub> O = 60 : 40	5.949/11.845	5.868/11.636





รูปที่ 5 TLC profile ของ fraction ต่างๆ (PF1 – PF7) ที่ได้จากการนำน้ำยาสกัด ethyl acetate มาแยก andrographolide ออกจากสารเจือปนอื่นๆ ด้วย silica gel column chromatography โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>  
 Developing solvent: chloroform : absolute ethanol = 85:15  
 Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in methanol

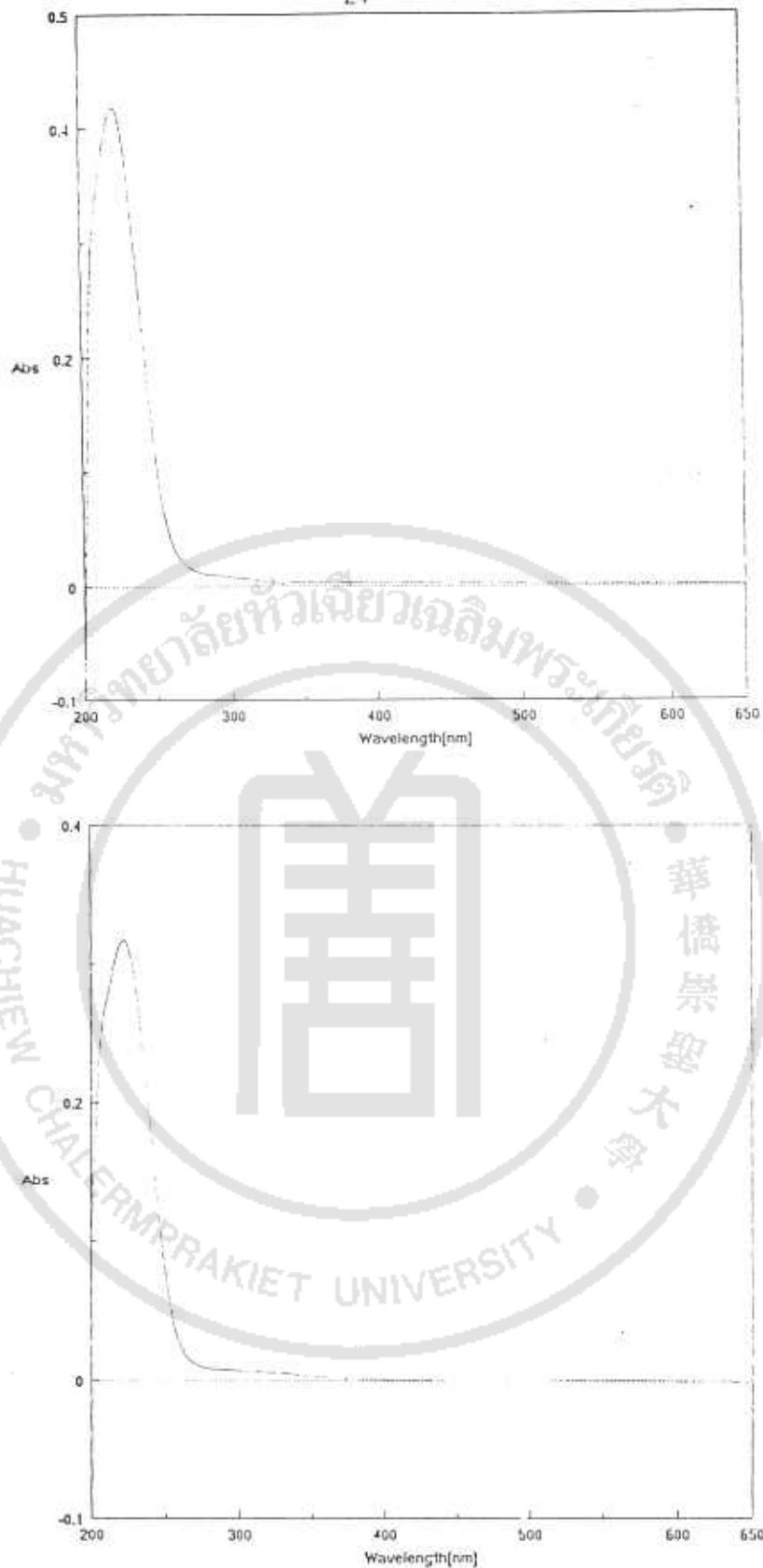


รูปที่ 6 TLC profile ของ fraction ต่างๆ (PF5-1 – PF5-6) ที่ได้จากการนำ fraction PF5 มาแยก andrographolide ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย silica gel column chromatography โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

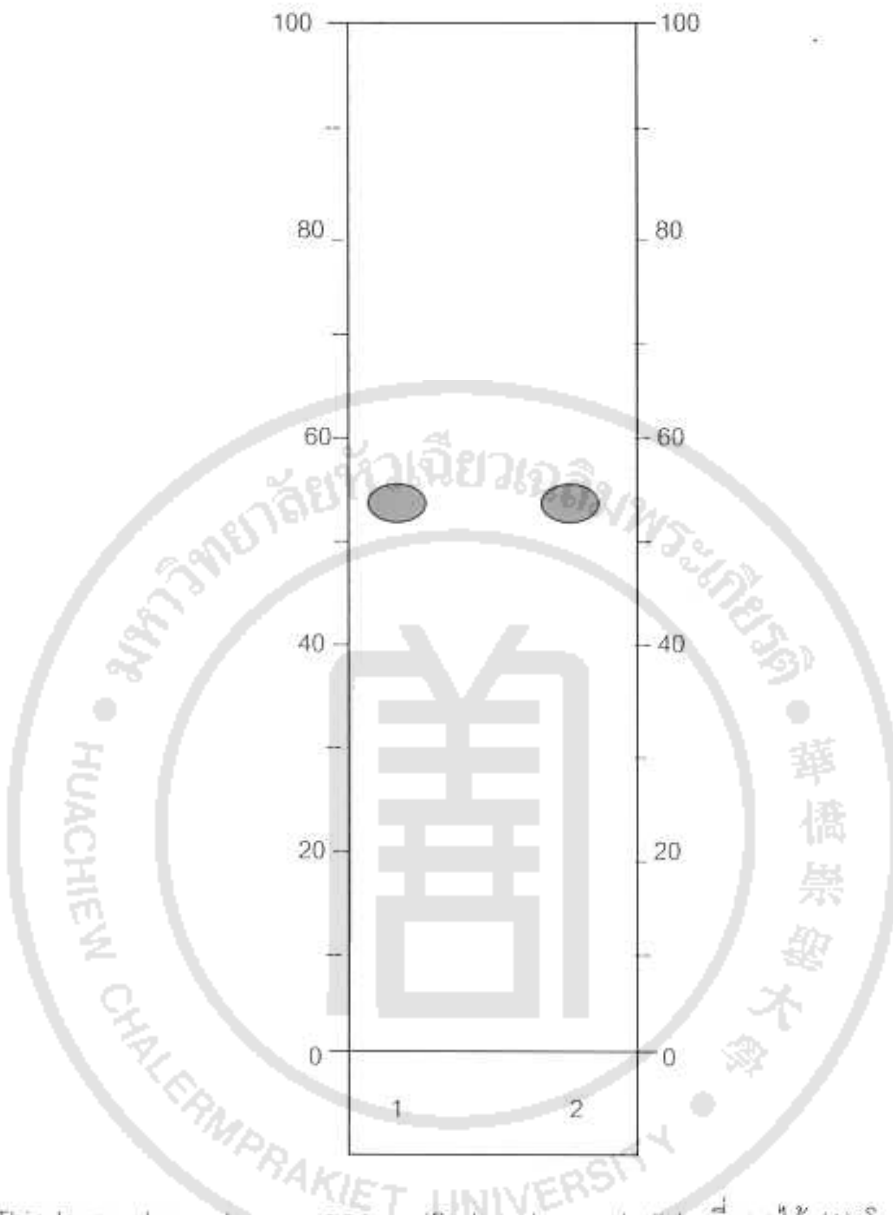
TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>

Developing solvent: chloroform : absolute ethanol = 85:15

Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in Methanol

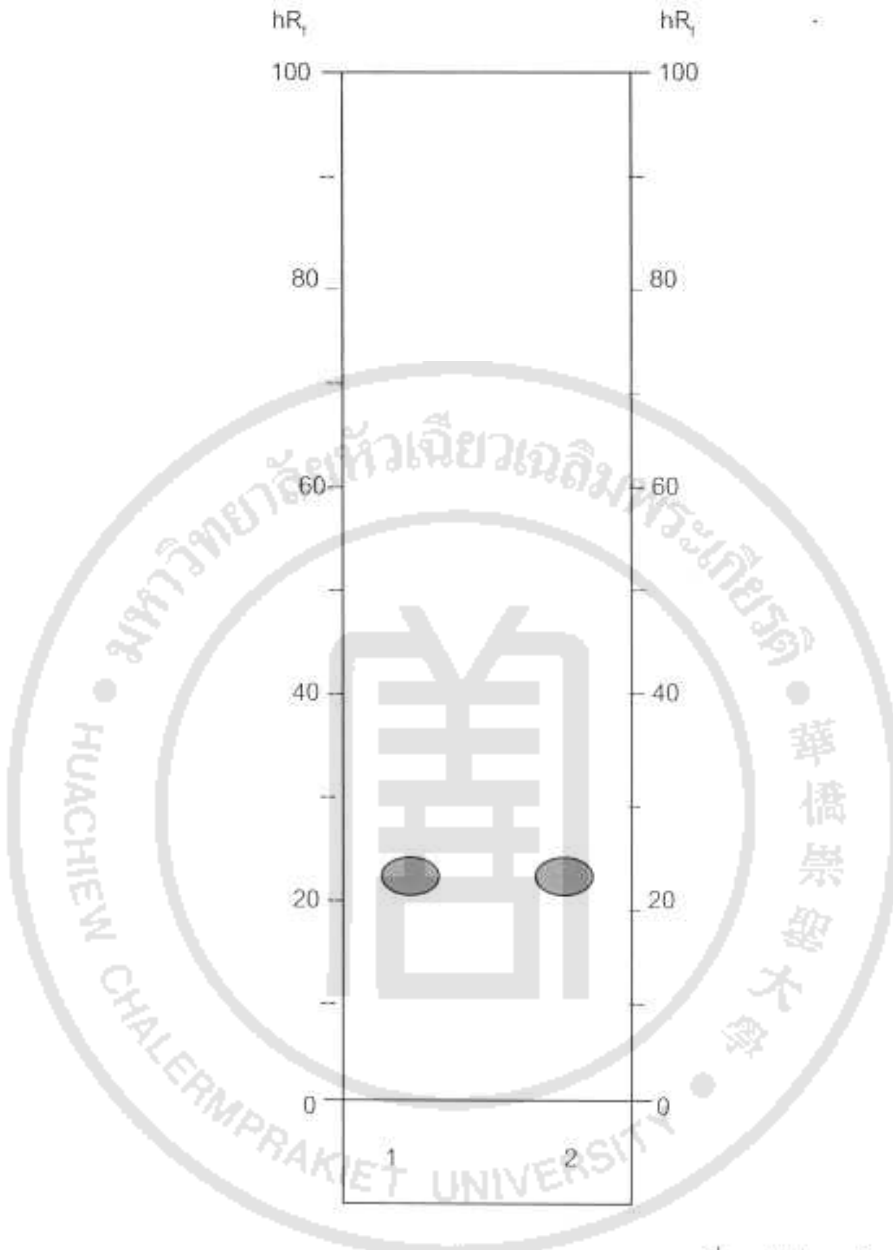


รูปที่ 7 เปรียบเทียบสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย andrographolide ที่แยกได้ใน methanol (บน) และสารละลายมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) ใน methanol (ล่าง)



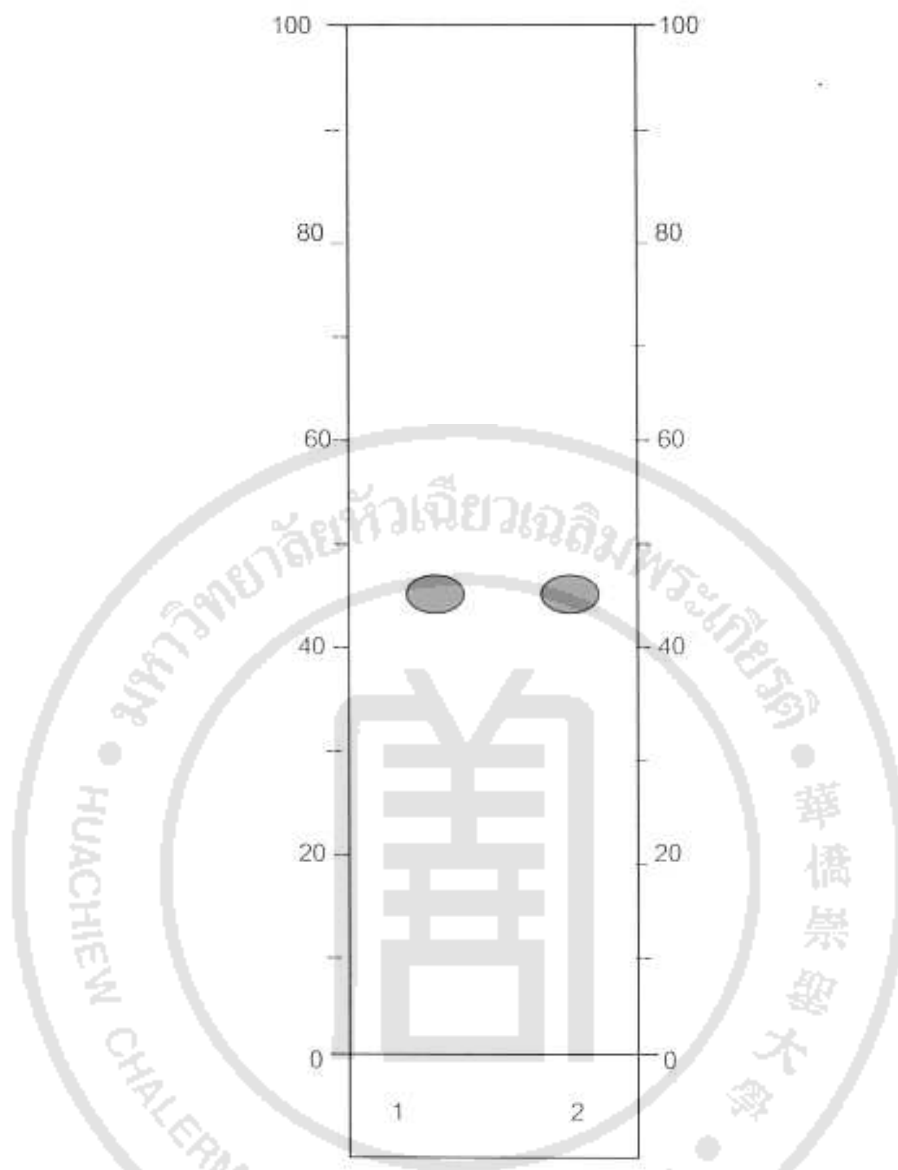
รูปที่ 8 Thin-layer chromatogram ของ purified andrographolide ที่แยกได้ (1) โดยเปรียบเทียบ  
กับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>  
 Developing solvent: chloroform : methanol = 85:15  
 Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in  
 Methanol



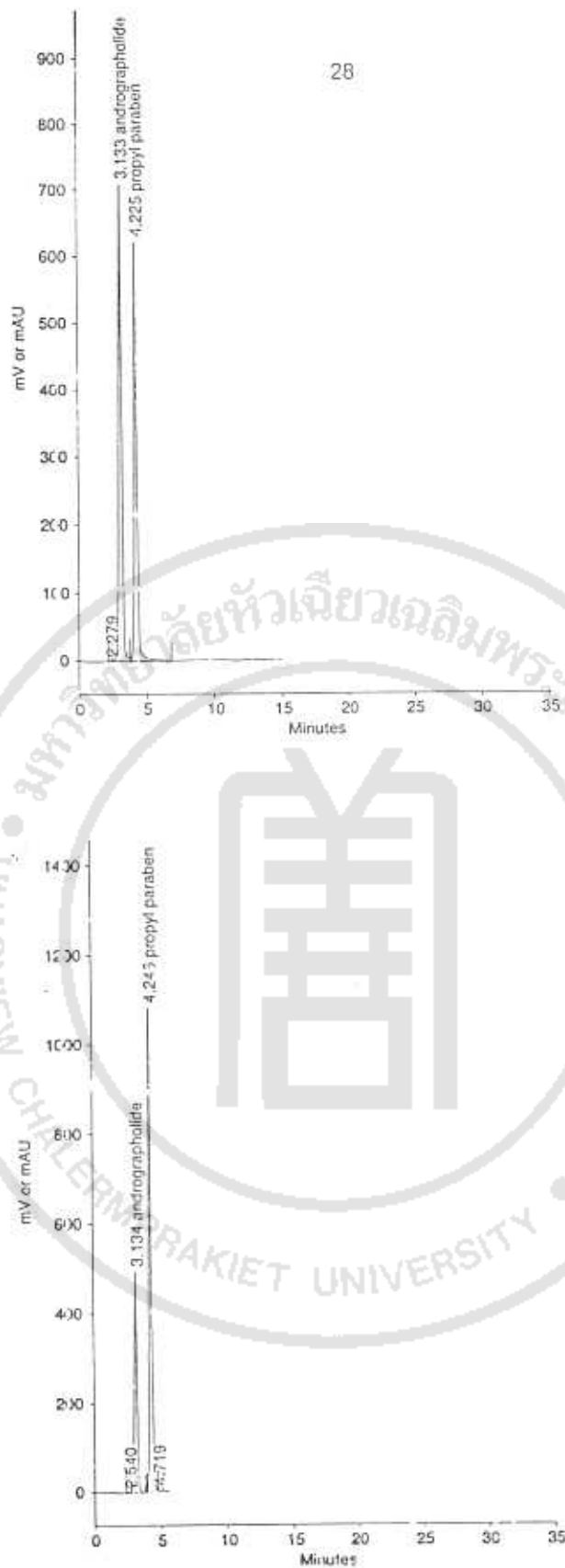
รูปที่ 9 Thin-layer chromatogram ของ purified andrographolide ที่แยกได้ (1) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>  
 Developing solvent: acetone : methanol = 90:10  
 Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in methanol

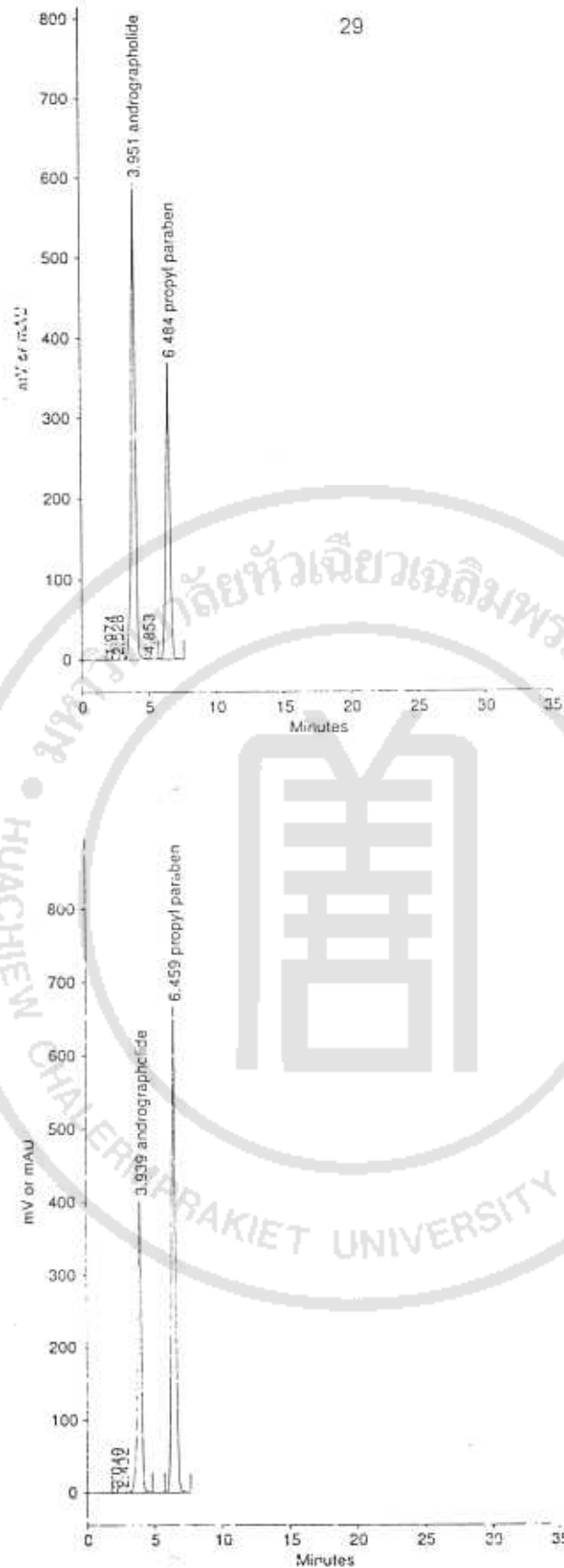


รูปที่ 10 Thin-layer chromatogram ของ andrographolide ที่แยกได้ (1) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) (2)

TLC plate:	silica gel GF <sub>254</sub>
Developing solvent:	n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80
Detection:	3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in methanol

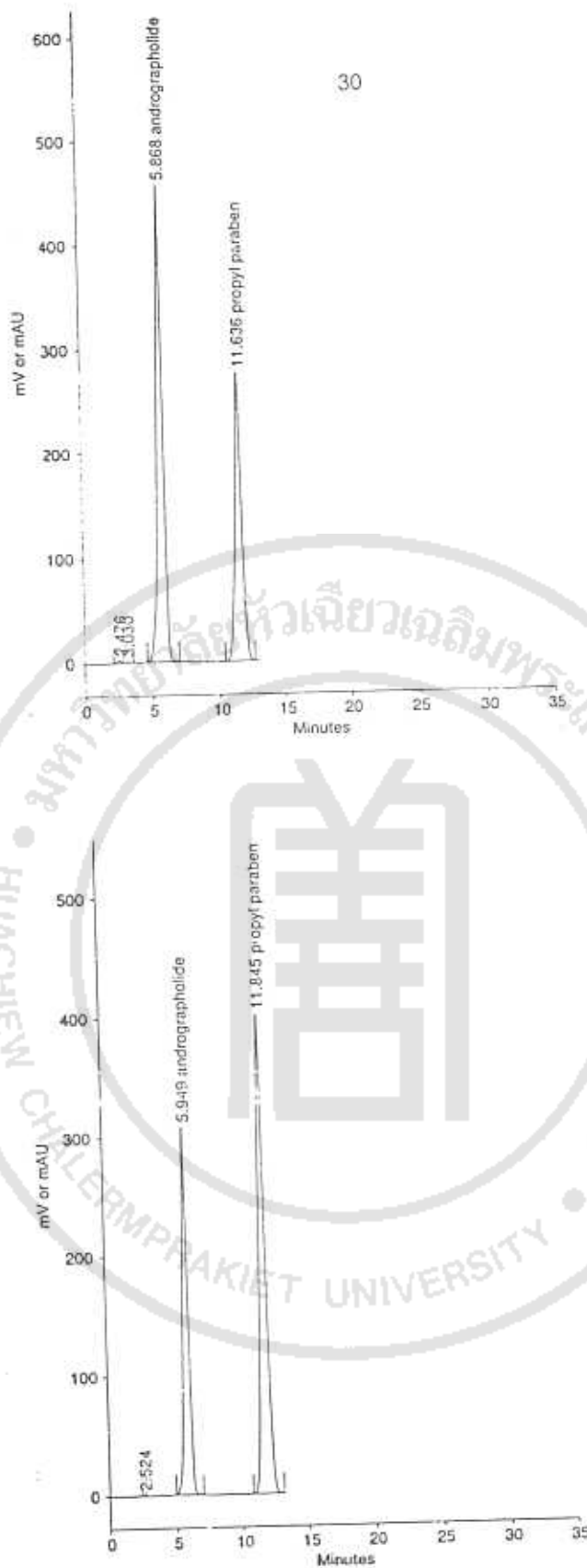


รูปที่ 11 เปรียบเทียบ HPLC Chromatogram ของ purified andrographolide ที่แยกได้ (บน) กับ สารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®, ล่าง) (condition: column  $C_{18}$ , Luna® 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.d; mobile phase: MeOH:H<sub>2</sub>O 80:20, flow rate 1 ml/min.; detection UV 255 nm; internal standard: propyl paraben)



รูปที่ 12 เปรียบเทียบ HPLC Chromatogram ของ purified andrographolide ที่แยกได้ (บน) กับ สารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®, ล่าง) (condition: column C<sub>18</sub>, Luna® 10 µm, 250 x 4.6 mm i.d; mobile phase: MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30, flow rate 1 ml/min.; detection UV 255 nm; internal standard: propyl paraben)





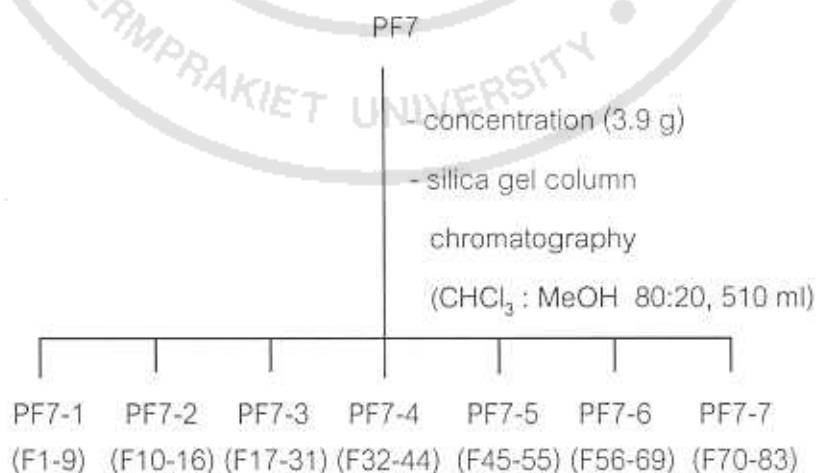
รูปที่ 13 เปรียบเทียบ HPLC Chromatogram ของ purified andrographolide ที่แยกได้ (บน) กับ สารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®, ล้าง) (condition: column  $C_{18}$ , Luna® 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.d; mobile phase: MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40, flow rate 1 ml/min.; detection UV 255 nm; internal standard: propyl paraben)

#### 4.1.5 การแยก neoandrographolide

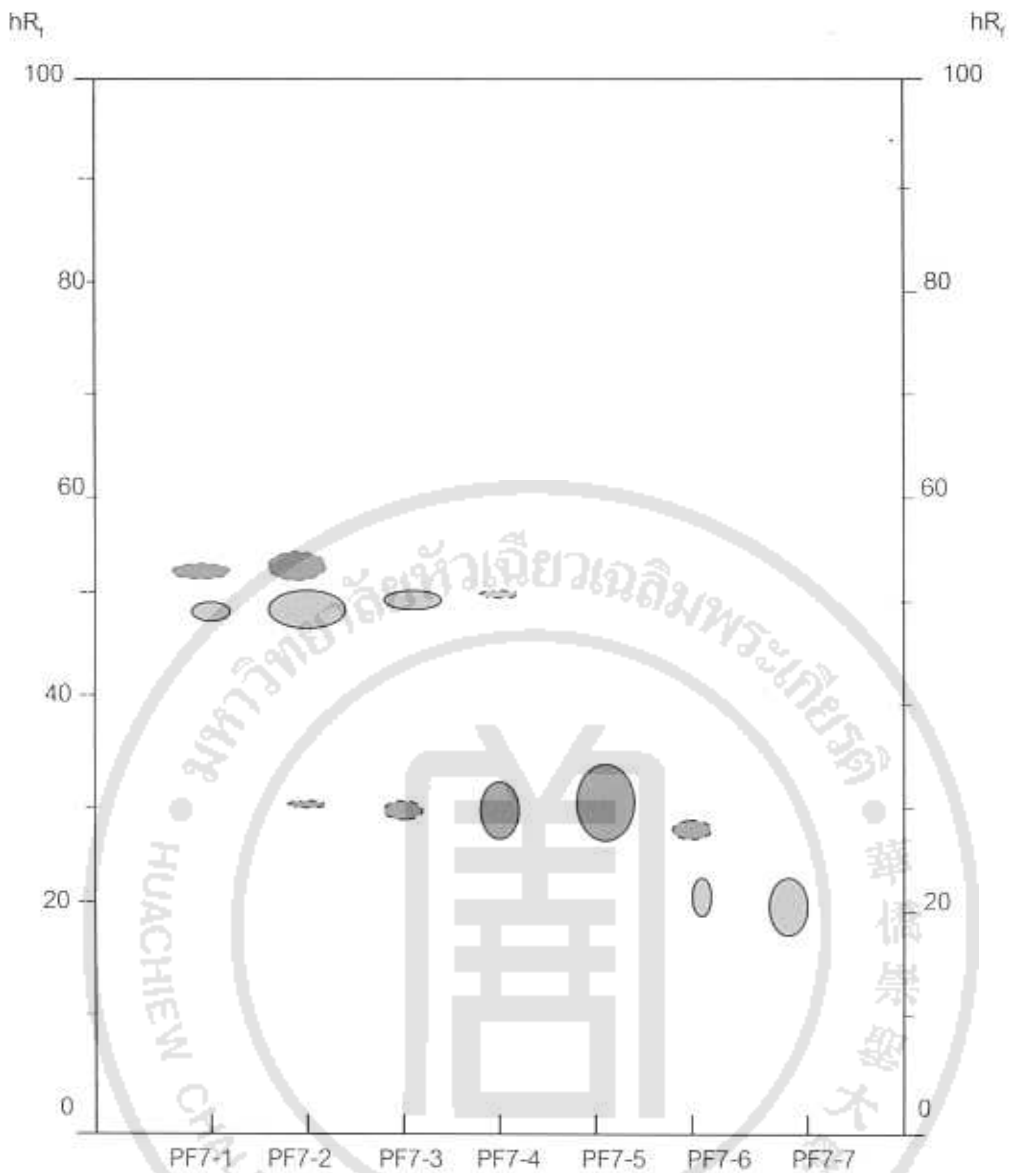
น้ำ PF7 (รูปที่ 4) ที่ได้จากการนำน้ำยาสกัด ethyl acetate ผ่าน silica gel column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 2.5 ซม. ความยาว 70 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ใน chloroform (สูงประมาณ 60 ซม.) มาแยกสารเจือปนอื่นๆ ออกจาก neoandrographolide ด้วยวิธี column chromatography ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ในสารละลายผสมของ chloroform : methanol = 80:20 (รูปที่ 14) เก็บ fraction (~6 ml) โดยใช้ fraction collector ตรวจสอบว่ามี neoandrographolide ใน fraction ได้ด้วยวิธี TLC (TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>, DVS: chloroform : absolute ethanol = 85:15) รวม fractions ที่มี TLC profiles คล้ายคลึงกัน (เช่น PF7-1 มาจากการรวม fractions 1 - 9 ซึ่งมี TLC profiles คล้ายคลึงกัน เป็นต้น)

รูปที่ 15 แสดง TLC profile ของ fraction ต่างๆ (PF7-1 - PF7-7) ที่ได้จากการนำ fraction PF7 มาแยก neoandrographolide ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย silica gel column chromatography เนื่องจากยังไม่มีสารมาตรฐานหรือสารสังเคราะห์ neoandrographolide จำหน่าย จึงต้องอาศัยข้อมูลจากเอกสารในการอ้างอิงก่อน จากรูปที่ 15 พบว่า fraction PF7-5 มีองค์ประกอบเดียว และเมื่อเปรียบเทียบกับ TLC profile ของน้ำยาสกัดจากฟ้าทะลายโจรใน Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. I, 1995: 30) และในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (เย็นจิตร จิวเวษดำรงศักดิ์กุล และคณะ. 2530: 235) พบว่ามี hR<sub>f</sub> value เท่ากัน คือ 30

นำ fraction PF7-5 มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการตกผลึกซ้ำหลายๆ ครั้งด้วย chloroform และ hexane จะได้ผลึกของ neoandrographolide รูปเข็มสีขาว (29 mg)



รูปที่ 14 แผนผังแสดงการแยก neoandrographolide ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ



รูปที่ 15 TLC profile ของ fraction ต่างๆ (PF7-1 – PF7-7) ที่ได้จากการนำ fraction PF7 มาแยก neoandrographolide ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย silica gel column chromatography

TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>  
 Developing solvent: chloroform : absolute ethanol = 85:15  
 Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in methanol

#### 4.1.6 การตรวจเอกลักษณ์ neoandrographolide

นำผลึก neoandrographolide ที่แยกได้ ไปตรวจเอกลักษณ์โดย

4.1.6.1 การวัดค่า melting point (m.p.) ของ neoandrographolide ด้วยเครื่อง Melting point apparatus (Electrothermal IA 9200, USA)

พบว่า m.p. ของ neoandrographolide ที่แยกได้ = 168-169°C [Lit.:168-169°C (A Dictionary of Chinese Materia medica, Supplement. 1979; 487); 169-171°C (Chen and Liang. 1982: 245-246)]

4.1.6.2 การวัดการดูดกลืนแสง UV ของ neoandrographolide ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer (Jasco, V-530) (รูปที่ 16)

พบว่า UV max ของผลึก neoandrographolide ที่แยกได้ใน methanol = 207 nm [Lit.: 205 nm (Chan et al. 1971: 5081-5091)]

4.1.6.3 การตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) บนแผ่น silica gel GF<sub>254</sub> ใช้ Developing Solvent System (DVS) 3 ระบบดังนี้

A. chloroform : absolute ethanol = 85 : 15 และสเปรย์ด้วย Kedde reagent

พบว่า มี spot เดียวและเมื่อเปรียบเทียบกับ TLC profile ของน้ำยาสกัดจากฟ้าทะลายโจรใน Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. I, 1995: 30) และในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (เย็นจิตร จิวเวฑิตำรงค์กุล และคณะ. 2530: 235) พบว่ามีสีม่วงแดงเหมือนกันและ hR<sub>f</sub> value เท่ากัน คือ 30

B. chloroform : methanol = 7 : 1 และสเปรย์ด้วย 20% sulfuric acid in methanol ตามด้วยการทำ plate ให้ร้อนที่ 120°C เป็นเวลา 10 นาที

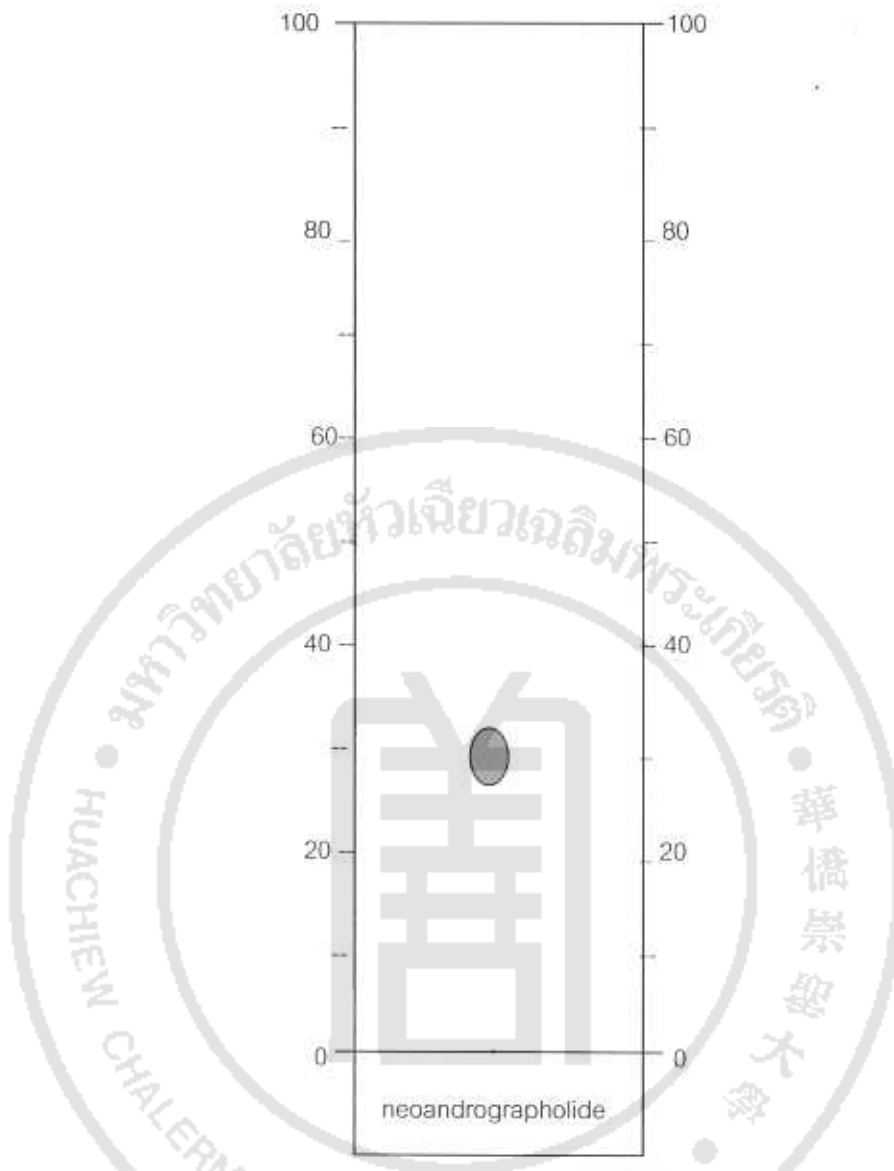
พบว่า มี spot เดียวและเมื่อเปรียบเทียบกับ TLC profile ของน้ำยาสกัดจากฟ้าทะลายโจรใน Indian Herbal Pharmacopoeia (Vol. I, 1998: 24) พบว่ามีสีชมพูเหมือนกัน และมี hR<sub>f</sub> value เท่ากัน คือ 39

C. n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80 และสเปรย์ด้วย Kedde reagent

พบว่า มี spot เดียว สีม่วงแดง และ hR<sub>f</sub> value เท่ากัน 25

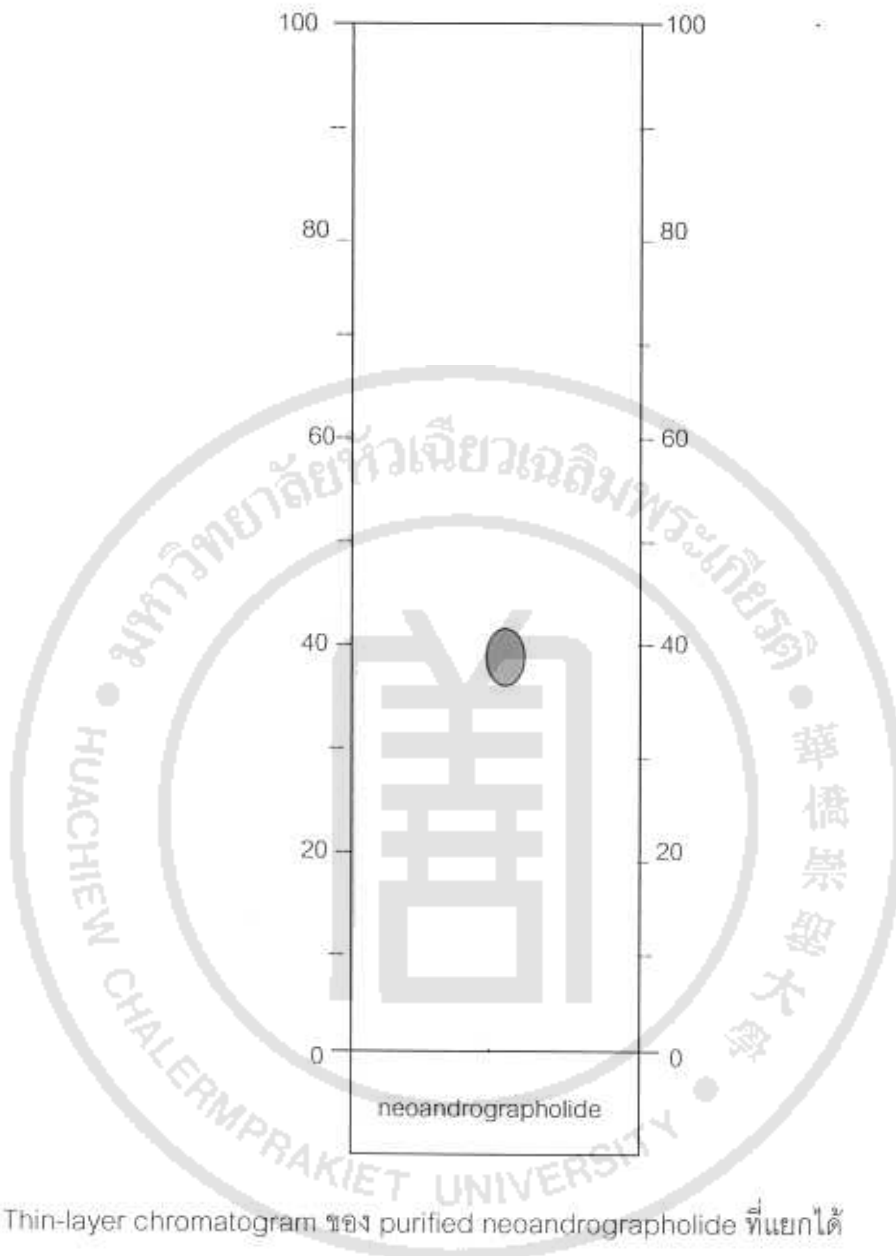


รูปที่ 16 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย neoandrographolide ที่แยกได้ใน methanol



รูปที่ 17 Thin-layer chromatogram ของ purified neoandrographolide ที่แยกได้

- TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>
- Developing solvent: chloroform : absolute ethanol = 85:15
- Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in methanol



รูปที่ 18 Thin-layer chromatogram ของ purified neoandrographolide ที่แยกได้

TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>

Developing solvent: chloroform : methanol = 7 : 1

Detection: 20% sulfuric acid in methanol, heat at 120°C, 10 min.



รูปที่ 19 Thin-layer chromatogram ของ purified neoandrographolide ที่แยกได้

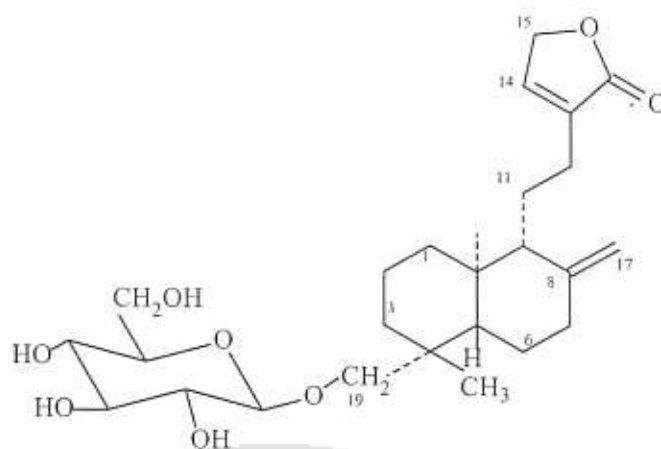
- TLC plate: silica gel GF<sub>254</sub>
- Developing solvent: n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80
- Detection: 3,5-Dinitrobenzoic acid / Potassium hydroxide in methanol



4.1.6.4 การตรวจเอกลักษณ์ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer (JNM-A500) โดยใช้  $CD_3OD$  เป็นสารละลาย

จากข้อมูลของ 1D- / 2D- $^1H$  NMR spectra (รูปที่ 20, 21) และ ข้อมูลจากวารสาร (Chan et al. 1971: 5081-5091; Balmain and Connolly. 1973: 1247-1251 และ Du et al. 2003: 147-151) ทำให้สามารถทำนายสูตรโครงสร้างและ ลำดับการเชื่อมต่อของแต่ละส่วนของโมเลกุล neoandrographolide ดังตารางที่ 3 โดยพบว่า olefinic proton (H-14) ของ neoandrographolide ใน  $CD_3OD$  จะมี สัญลักษณ์ เกิดขึ้นที่  $\delta$  7.32 (m) methenyl protons (H-17) มีสัญญาณ ณ  $\delta$  4.85 และ 4.62 ส่วน allylic proton (H-12) ปรากฏที่  $\delta$  2.1 (m) และ  $\delta$  2.5 (m) โปรตอน ของ methyl group (Me-18 และ Me-20) มีสัญญาณเกิดขึ้นที่  $\delta$  1.02 และ 0.70 ตามลำดับ สำหรับ H-19 ปรากฏที่  $\delta$  3.22 (d,  $J=9.5$ ) และ 4.09 (d,  $J=9.5$ )

จากข้อมูล 2D - COSY  $^1H$  NMR spectra (รูปที่ 21) ยืนยัน proton couplings ในช่วง  $\delta$  3.0 - 7.5 โดยพบ strong crosspeaks ของการ coupling โปรตอนดังนี้  $H - 14 \leftrightarrow H - 15$ ;  $H - 11 \leftrightarrow H - 12$ ;  $H - 17 \leftrightarrow H - 17$  นอกจากนี้ยังพบ weaker crosspeaks ของ long range proton couplings ระหว่าง  $H - 7 \leftrightarrow H - 17$  และ  $H - 9 \leftrightarrow H - 17$

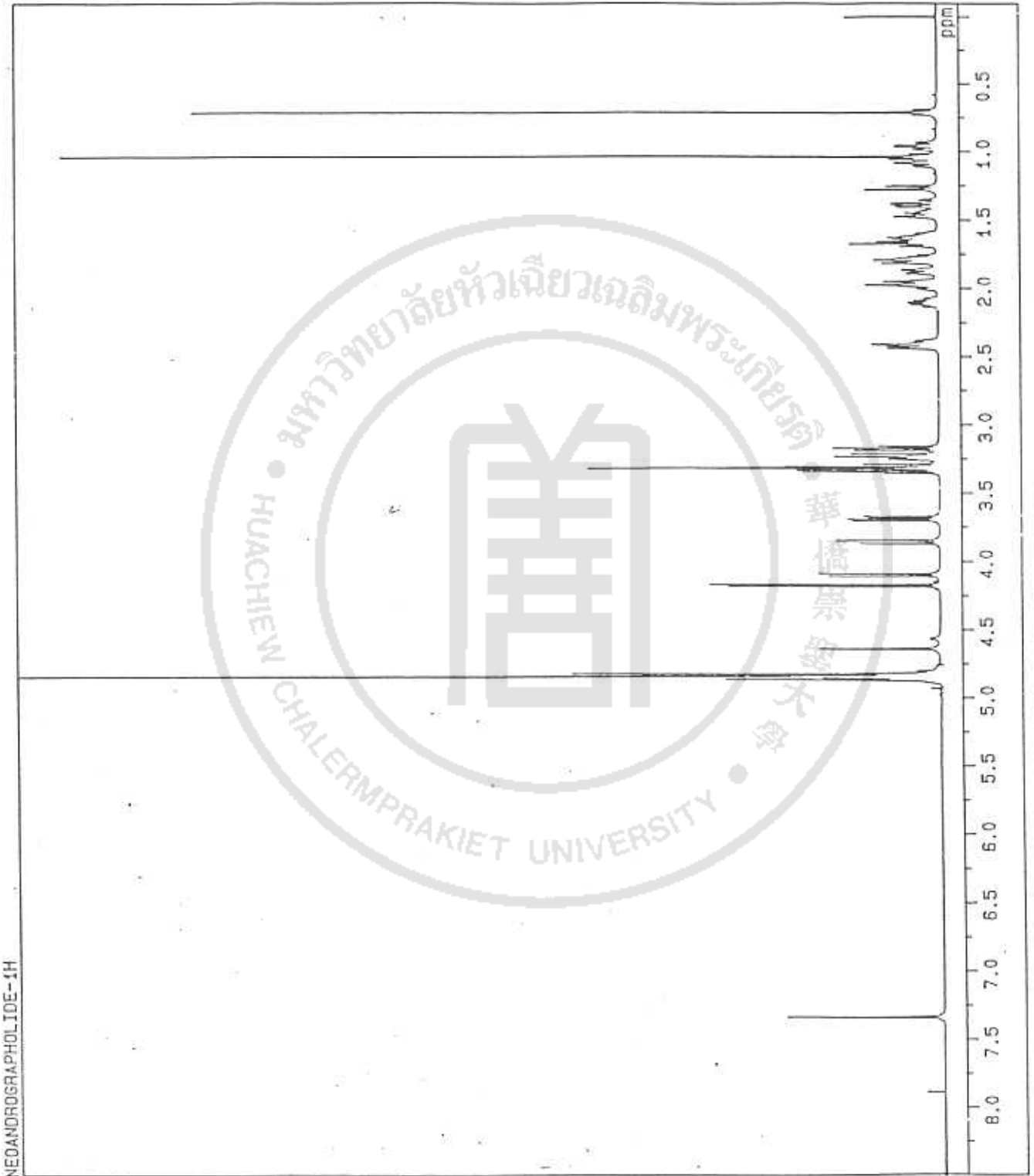


ตารางที่ 3  $^1\text{H}$  NMR data ของ neoandrographolide ใน  $\text{CD}_3\text{OD}$

Proton	Purified neoandrographolide	Neoandrographolide (ข้อมูลจากวารสาร*)
H-15a, 15b	4.81 (2H, d, $J=2$ )	4.78 (2H, d, $J=1.8$ )
H-14	7.32 (1H, m)	7.17 (1H, m)
H-17a, 17b	4.62 (1H, s) 4.85 (1H, s)	4.43 (1H, s) 4.84 (1H, s)
H-12a, 12b	2.1 (1H, m) 2.4 (1H, m)	2.2 (1H, m) 2.5 (1H, m)
Me-18	1.02 (3H, s)	0.93 (3H, s)
Me-20	0.70 (3H, s)	0.68 (3H, s)
H-19a, 19b	3.22 (1H, d, $J=9.5$ ) 4.10 (1H, d, $J=9.5$ )	3.52 (1H, d, $J=9.5$ ) 4.32 (1H, d, $J=9.5$ )
Glucosyl protons (2H)	3.6-4.2	-
Glucosyl protons (4H)	3.1-3.4	-

(Table entries are chemical shift in ppm from TMS (number of protons, multiplicity,  $J$  in Hz)

\*Chan et al. 1971: 5081-5091 ; Balmain and Connolly. 1973: 1247-1251 และ Du et al. 2003: 147-151

รูปที่ 20 1D -  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ neoandrographolide ใน  $\text{CD}_3\text{OD}$

