582.14048
ส 697ก
ฉ.3

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจากหัวร้อยรู

ปริญญานิพนธ์

ของ

สาธวย ชาทรัพย์

24 ก.ค. 2534

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
กุมภาพันธ์ 2534
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

173074

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

..... ประธาน
(รศ.ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

..... กรรมการ
(ผศ.ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
(รศ.ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

..... กรรมการ
(ผศ.ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร.จินดา แต้มบรรจง)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)
วันที่ 18 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ. ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล ผศ. ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล และ ดร. จินดา แต้มบรรจง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยลุนด์ ประเทศสวีเดน ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการวิเคราะห์สารขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ และญาติมิตรทุกท่านที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือผู้วิจัยจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

สำรวย ชาทรัพย์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	2
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	6
3	วิธีดำเนินการทดลอง	9
	การสกัดสารจากหัวร้อยรู	9
	การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารประกอบอินทรีย์	9
	การทดสอบอัลคาลอยด์	9
	การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	10
	การทดสอบฟลาโวนอยด์	11
	การตรวจสอบซาโปนิน	12
	การทดสอบคูมาริน	12
	การแยกสารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล	13
	เครื่องมือวิเคราะห์โครงสร้างสาร	13

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลอง	15
	ผลการสกัดสารจากหัวร้อยรู	15
	ผลการทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสารประกอบอินทรีย์ ...	15
	ผลการทดสอบอัลคาลอยด์	15
	ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	16
	ผลการทดสอบฟลาโวนอยด์	17
	ผลการทดสอบซาโปนิน	17
	ผลการทดสอบคูมาริน	18
	ผลการแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์	18
	ผลการแยกสารสกัดเฮกเซน	18
	ผลการแยกสารสกัดคลอโรฟอร์ม	20
	ผลการแยกสารสกัด เมทานอล	23
	การวิเคราะห์สาร	26
	การวิเคราะห์สาร ก.	26
	การวิเคราะห์สาร ข.	27
	การวิเคราะห์สาร ค.	27
	การวิเคราะห์สาร ง.	28
5	สรุปและอภิปรายผล	29
	สรุปผล	29
	อภิปรายผล	29

หน้า

บรรณานุกรม 31

ภาคผนวก 34

ประวัติย่อของผู้วิจัย 49

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์	15
2	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	16
3	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์	17
4	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน	18
5	ผลการแยกสารสกัดเฮกเซน โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	19
6	ผลการแยกสารสกัดเฮกเซน จากการรวมลำดับส่วนที่ 39-41 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	20
7	ผลการแยกสารสกัดคลอโรฟอร์มด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	21
8	ผลการแยกสารส่วนที่เหลือ จากการตกผลึกสาร ค. โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	22
9	ผลการแยกสารสกัดเมทานอลโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	24
10	ผลการแยกสารจากการรวมลำดับส่วน 55 - 86 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	25

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของสารในวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม	8
2	แผนภูมิแสดงการสกัดการแยก และการทำสารจากหัวร้อยรูให้บริสุทธิ์	14
3	แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร ก.	37
4	แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ ^{1}H-NMR (300 MHz, CDcl$_3$) ของสาร ก.	38
5	แสดงแมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ค่า m/e ของสาร ก.	39
6	แสดงสเปกตรัมมาตรฐานการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ของเบต้า-ไซโตสเตอรอล	40
7	แสดงสเปกตรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์ ^{1}H- NMR (60 MHz, CDcl$_3$) ของเบต้า-ไซโตสเตอรอล	41
8	แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร ข.	42
9	แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ ^{1}H-NMR (300 MHz, CDcl$_3$) ของสาร ข.	43
10	แสดงสเปกตรัมการวิเคราะห์ค่า ^{13}C-NMR (300 MHz, CDcl$_3$) ของสาร ข.	44
11	แสดงสเปกตรัมความสัมพันธ์ ^{1}H - ^{13}C-NMR (300 MHz, CDcl$_3$) ของสาร ข.	45
12	แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร ค.	46
13	แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ ^{1}H-NMR (60 MHz, CDcl$_3$)ของสาร ค.	47
14	แสดงแมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ m/e ของสาร ค.	48

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

การใช้สมุนไพรบำบัดอาการของโรคต่าง ๆ เป็นวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีอยู่ในประเทศที่พัฒนาแล้ว หรือประเทศที่กำลังพัฒนา สำหรับประเทศที่พัฒนาแล้วนำสมุนไพรไปผลิตในรูปแบบต่าง ๆ กลับมาขายในประเทศที่ยังด้อยทางเทคโนโลยี ด้วยเหตุนี้จึงมีการสนับสนุนให้ศึกษาสมุนไพร โดยนำมาสกัดและแยกสารสำคัญมาใช้ประโยชน์ สารประกอบสำคัญที่พบในพืชสมุนไพรส่วนใหญ่ ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloid) กลูโคไซด์ (glucoside) เรซิน (resin) และแทนนิน (tannin)

หัวร้อยรู (Hydnophytum formicarium Jack) เป็นสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม (RUBIACEAE) เช่นเดียวกับ กาแฟ (Coffea arabica-Linn.) กระท่อม (Mitrahyna speciosa Korth.) ยอ (Marinda citrifalia Linn.) และหมากดิบน้ำค้าง (Oldenlandia biffora-Linn.) หัวร้อยรูมีสมบัติในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้เช่น เป็นยาบำรุงหัวใจ ขับพยาธิในท้อง แก้พิษในข้อและกระดูก (ปราโมทย์ ศรีภิรมย์. 2524 : 92) รักษาโรคเบาหวานตามตำรับพระวัย จต. ตาลโย วัดเทพพนมยงค์ จังหวัดสระบุรี (นพรัตน์ พัฒนเงิน. 2527 : 44) แต่ยังไม่มีการศึกษาทางเคมีของหัวร้อยรูมาก่อน ดังนั้นจึงควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหัวร้อยรู เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้สำหรับการวิจัยทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยาต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์โดยการทดสอบเบื้องต้น
2. เพื่อทำการสกัดสารบางชนิดจากหัวร้อยรู และทำสารที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้าง

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบประเภทของสาร และโครงสร้างของสารบางชนิดในหัวร้อยรู

2. เพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารบางชนิดต่อไป

3. อาจใช้เป็นข้อมูลในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์และสารอนุพันธ์ เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนายาใหม่ในอนาคต

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชทดลองคือหัวร้อยรู ใช้เฉพาะส่วนหัว เก็บจาก ตำบลวังแซ้ม อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี ในเดือนเมษายน 2530

2. การทดสอบเบื้องต้นเป็นการทดสอบหาสารประเภท อัลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซาโปนิน (saponin) และคูมาริน (coumarin)

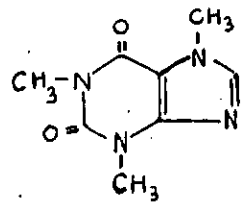
3. สกัดสารด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล และแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

4. ศึกษาโครงสร้างของสารประกอบบางชนิด โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) และแมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry)

นิยามศัพท์เฉพาะ

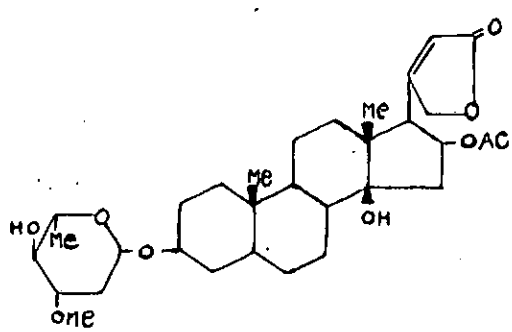
1. สมุนไพรคือ ยาที่ได้จากส่วนของพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งยังมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ

2. อัลคาลอยด์คือ สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) ที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุลตั้งแต่หนึ่งอะตอมขึ้นไป มีสมบัติเป็นเบส มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง อัลคาลอยด์หลายชนิดใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น คาเฟอีน (caffeine)



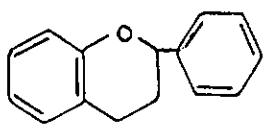
คาเฟอีน

3. คาร์ดิแอกไกลโคไซด์คือ สารประเภทไกลโคไซด์ที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเรียกว่า อไกลโคน หรือ เจนิน (aglycone or genin) กับส่วนที่เป็นน้ำตาลเรียกว่าไกลโคน (glycone) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ทางการแพทย์ใช้บำบัดผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว เช่น โอลีนดริน (Oleandrin)

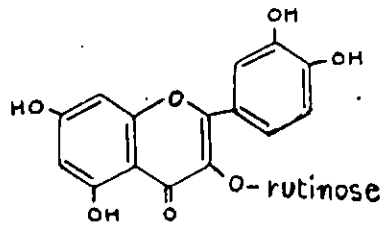


โอลีนดริน

4. ฟลาโวนอยด์ คือ สารประเภทไกลโคไซด์ มีโครงสร้างพื้นฐานของส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล เป็น คาร์บอน 6 อะตอม - คาร์บอน 3 อะตอม - คาร์บอน 6 อะตอม เรียกว่า ฟลาแวน (flavan) ละลายน้ำได้ดีเป็นสีที่พบในกลีบดอก ผล และ ใบ เช่น รูทิน (rutin)

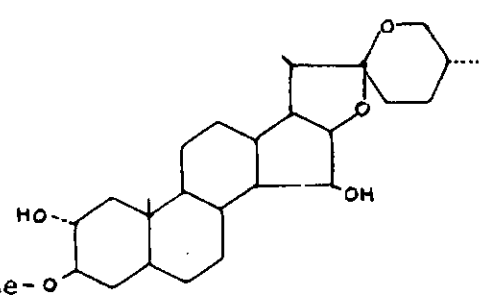


ฟลาแวน



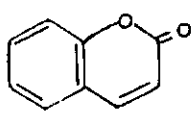
รูทิน

5. ซาโปนิน คือ สารประเภทไกลโคไซด์ชนิดหนึ่ง เมื่อถูกไฮโดรไลส์จะได้ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลซึ่งเรียกว่า ซาโปเจนิน (sapogenin) และส่วนน้ำตาลที่เรียกว่าไกลโคนซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สเตอรอยดอลซาโปเจนิน (steroidal sapogenin) และ ไตรเทอร์ปีนอยดอลซาโปเจนิน (triterpenoidal sapogenin) เช่น ดิจิโทนิน (digitonin)

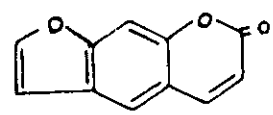


ดิจิโทนิน

6. คูมารินคือ สารที่มีโครงสร้างแบบเบนโซแอลฟาไพโรน (benzo-α-pyrone) อยู่ในโมเลกุล ไม่เป็นไกลโคไซด์ มีสมบัติเป็นยา เช่น โซราเลน (psoralen) ใช้รักษาโรคผิวหนัง



เบนโซ-แอลฟา-ไพโรน



โซราเลน

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หัวร้อยรู เป็นพืชสมุนไพรมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น ปุ่มฟ้า กระเช้าผีมด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Hydnophytum formicarium Jack. ซึ่งอยู่ในวงศ์ ยอ เข็ม กระท่อม มีลักษณะเป็นหัวใหญ่กลมโตขนาดมะพร้าวห้าว มีใบเล็กยาวคล้ายใบพายที่พายเรือ อาศัยเกาะอยู่ตามต้นและกิ่งไม้ใหญ่ ๆ ภายในหัวจะมีรูพรุนย้อนไปย้อนมาตลอดทั้งหัว พืชชนิดนี้จัดเป็นประเภทกล้วยไม้ มีสรรพคุณเป็นยาบำรุงหัวใจ ขับพยาธิในท้องแก้พิษในข้อและกระดูก ปรุงเป็นยารักษาแก้ข้อเท้าปวดบาม (ปราโมทย์ ศรีภิรมย์. 2524 : 92)

สุภาพ บุณยะรัตเวช (2523 : 117 - 141) ได้ทำการทดสอบสาร 5 ประเภท คือ อัลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมารินในพืชวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม 5 ชนิด คือ หัวร้อยรู เข็มขาว (Ixora coccinea Linn.) ยอ คัดเค้า (Randia siamensis Graib) และ จันทร์หอม (Tarenna hoaensis Pit.) ผลการทดสอบพบว่าในลำต้นของ เข็มขาว ยอ และคัดเค้ามีอัลคาลอยด์ ลำต้นของเข็มขาวและคัดเค้ามีฟลาโวนอยด์ พบซาโปนินในลำต้นของยอและคัดเค้า ส่วนลำต้นของหัวร้อยรู ใบและลำต้นของรากจันทร์หอม ตรวจไม่พบสารทั้ง 5 ประเภท

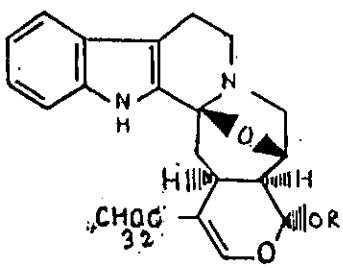
สมบัติ พุ่มสาขา (2530) ได้ศึกษาสมุนไพรตำรับที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน ซึ่งประกอบด้วยข้าวเย็นเหนือ (Smilax corbularia Benth.) ข้าวเย็นใต้ (Smilax china Linn.) เถือกเขาหนัง (Derris scandens Benth.) ทองพันชั่ง (Rhinacanthus nasutus Kurz.) พญารากดำ (Diospiros varigata Kurz.) สัก (Tectona grandis Linn.) หัวร้อยรูและหญ้าเกล็ดปลา (Phyla nodiflora Green.) พบว่าน้ำสกัดสมุนไพร (สมุนไพร ดังกล่าวอย่างละ 7.5 กรัม นำมาต้มกับน้ำกลั่น 240 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ปริมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยแอลลอกแซน (alloxan) หลังจากได้รับสารสกัด 1 ชั่วโมง

ได้มีการศึกษาคุณภาพวิเคราะห์ของหัวร้อยรู ซึ่งสกัดด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยใช้วิธี อินดัคทิฟลีคับเบิลพลาสมาอะตอมมิกอิมิชั่นสเปกโทรเมตรี (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) พบว่ามีธาตุ 22 ชนิดคือ Be Al Ca Cr Mn Fe Zn Ba P Li Sn Rb Hg Tl In Pb Cd As Ca Na K และ Mg (สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล และเชนโค ไยชิดา. 2531 : 31-35)

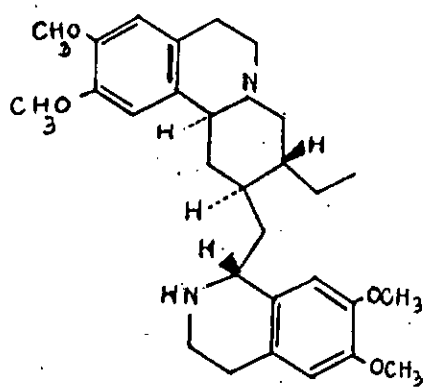
นอกจากนี้ได้มีการศึกษาสมุนไพรชนิดอื่นที่อยู่ในวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม เช่น ต้นหมากดิบ น้ำค้าง (อนันต์ ตั้งทองคำ.2521) พบว่าส่วนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีขี้ผึ้ง น้ำมัน ไมริซิลแอลกอฮอล์ (Myricil alcohol) และสติกมาสเตอร์รอล (stigmasterol) แฮนดาและคนอื่น ๆ (Handa and others. 1983 : 325-329) ได้แยกคาแดมบีน (Cadambine, 1) บริสุทธิ์จากใบของต้นกระท่อม (Anthocephalus chinensis A. Rich. ex Walp) มีผู้ศึกษาต้น Psychotria ipecacuanha Stokes พบว่ามีอีมีทีน (Emetine, 2) ปริมาณสูงและอัลคาลอยด์ชนิดนี้มีฤทธิ์ทำให้เกิดการอาเจียน (Wiegrebe and others. 1984 : 397-407)

เรเฮอร์และครอส (Reher and Kraus. 1984 : 172-174) ได้ทำการสกัดเปลือกต้น Cautarea latiflora ด้วยคลอโรฟอร์ม พบว่ามีนีโอฟลาโวนอยด์ (Neoflavonoid, 3) สารชนิดนี้มีลักษณะผลึกสีเหลือง สลายตัวที่อุณหภูมิ 335-342°C ดีซิลวา และคนอื่น ๆ (Desilva and others. 1987 : 1184) ได้นำเนื้อไม้ของต้น Wendlandia bicuspidata มาสกัดด้วยเมทานอล และทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบสแกนโดไซด์เมทิลเอสเทอร์ (Scandoside methyl ester, 4)

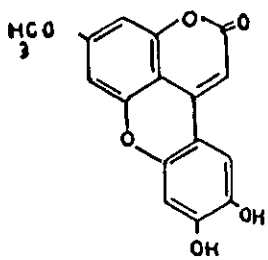
พืชอีกชนิดหนึ่งของวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม ที่ได้ศึกษา คือ ต้น Exostema caribaeum Roem. et Schult พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของพืชชนิดนี้มีสารคูมาริน 3 ชนิด คือ 5-ไอ-เบต้า-ดี-กาแลคโตซิล-7-เมทอกซี-4', 5'-ไดไฮดรอกซี-4-ฟินิลคูมาริน [5-O-β-D-galactosyl-7-methoxy-4', 5'-dihydroxy-4-phenyl coumarin (5)] 7,4',5'-ไตรไฮดรอกซี-4-ฟินิล-5, 2'-ออกซิโด-คูมาริน [7,4',5'-trihydroxy-4-phenyl-5,2'-oxido-coumarin (6)] และ 7,4'-ไดเมทอกซี-5'-ไฮดรอกซี-4-ฟินิล-5, 2'-ออกซิโด-คูมาริน [7,4'-dimethoxy-5'-hydroxy-4-phenyl-5, 2'-oxido-coumarin (7)] (Mata and others 1987 : 866-871) สูตรโครงสร้างของสาร (1-7) แสดงไว้ในภาพประกอบ 1



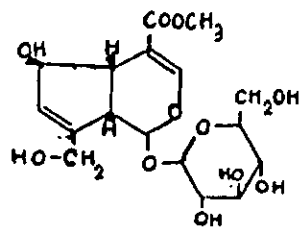
1 R = glucose



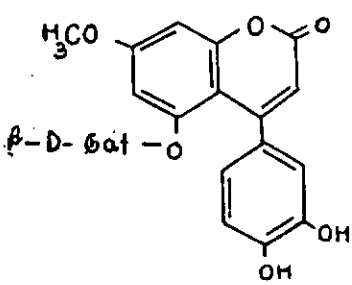
2



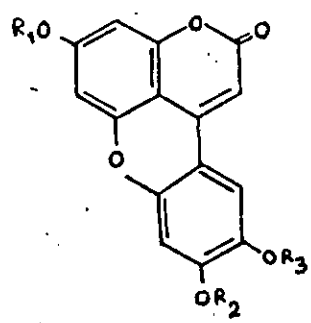
3



4



6



6 $R_1 = R_2 = R_3 = H$

7 $R_1 = R_2 = Me$, $R_3 = H$

ภาพประกอบ 1 แสดงโครงสร้างของสารในวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม

1. คาแคมบิน
2. อีมีทีน
3. นีโอฟลาโวนอยด์
4. สแกนโดไซด์เมทิลเอสเทอร์
5. 5-โอ-เบต้า-ดี-กาแลคโตซิล-7-เมทอกซี-4', 5'-ไดไฮดรอกซี-4-พินิลคูมาริน
6. 7, 4', 5'-ไตรไฮดรอกซี-4-พินิล-5, 2'-ออกซิโด-คูมาริน
7. 7, 4'-ไดเมทอกซี-5'-ไฮดรอกซี-4-พินิล-5,2'-ออกซิโด-คูมาริน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. <u>การสกัดสารจากหัวร้อยรู</u>

นำหัวร้อยรูที่แห้งบดละเอียดมาสกัดด้วยเฮกเซน 3 ครั้ง โดยแช่ครั้งละ 2 สัปดาห์ กรอง และนำสารละลายที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้งรวมกัน นำไประเหยเอาเฮกเซนออกโดยใช้เครื่องกลั่นลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดเฮกเซน (crude) ส่วนกากของพืชนำไปสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม และเมทานอลตามลำดับ และระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้วิธีข้างต้น ได้สารสกัดคลอโรฟอร์ม และเมทานอลตามลำดับ นำสารสกัดทั้ง 3 นี้ไปทำการทดสอบเบื้องต้น และแยกด้วยโครมาโทกราฟีต่อไป

2. <u>การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารประกอบอินทรีย์</u>

การทดสอบประเภทของสารใช้วิธีทดสอบทั่วไปในห้องปฏิบัติการ (Farnsworth. 1966) การเตรียมรีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์อยู่ในภาคผนวก

2.1 <u>การทดสอบอัลคาลอยด์</u>

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์นิยมทำให้อัลคาลอยด์ตกตะกอนโดยรีเอเจนต์ต่าง ๆ ได้แก่ แวกเนอร์ (Wagner's reagent) เมเยอร์ (Mayer's reagent) และดราเจนดรอฟรีเอเจนต์ (Dragendroff's reagent)

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำสารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอลอย่างละประมาณ 1 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารสกัดแต่ละชนิด เติมซีไลท์ลงไป กรองและแบ่งสารละลายที่ได้ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด นำแต่ละหลอดมาทดสอบโดยใช้ดราเจนดรอฟ แวกเนอร์ และมาร์มรีเอเจนต์ เทียบสี และตะกอนกับหลอดเปรียบเทียบ

2.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1) การทดสอบด้วยเคดด์รีเอเจนต์ (Kedde's reagent) ใช้ทดสอบส่วนที่ไม่อิ่มตัวของแลคโทนที่ตำแหน่งแอลฟาและเบต้า (α,β -unsaturated lactone)

2) การทดสอบด้วยปฏิกิริยาเคลเลอร์-คิไลนี (Keller-Kiliani-reaction) ใช้ทดสอบน้ำตาลดีออกซี (deoxy sugar) จะให้สีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นและสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียว

3) การทดสอบด้วยปฏิกิริยาลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด (Libermann-Berchard reaction) ใช้ทดสอบสเตอรอยด์ จะให้สีเขียวในระยะ 1 ชั่วโมง โดยสีจะเปลี่ยนจากชมพู —> แดง —> ม่วง —> น้ำเงิน —> เขียว (การเปลี่ยนสีอาจแตกต่างกันบ้างแล้วแต่ชนิดของสาร)

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำสารสกัด 1 กรัม เติมเลดอะซิเตดเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนให้เข้ากัน อุ่น 15 นาที พร้อมทั้งคนตลอดเวลากรอง และนำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมชั้นคลอโรฟอร์มและเติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากความชื้น กรอง นำไประเหยเอาคลอโรฟอร์มออกจนเหลือปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรเดิม ทำให้เย็นแบ่งสารละลายที่ได้เป็น 3 หลอด และทำการทดสอบดังนี้

1. <u>การทดสอบด้วยเคดด์รีเอเจนต์</u>

นำสารละลายคลอโรฟอร์มหลอดที่ 1 มาระเหยจนเกือบแห้ง หยดเคดด์รีเอเจนต์ลงไป 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมล/ลูกบาศก์-เดซิเมตร จำนวน 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2. <u>การทดสอบด้วยปฏิกิริยาเคลเลอร์-คิไลนี</u>

เติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์รีเอเจนต์ จำนวน 3 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงในสารละลายหลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากันเอียงหลอดทดลอง แล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจำนวน 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงข้างหลอด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

3. การทดสอบด้วยปฏิกิริยาลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด

นำสารละลายหลอดที่ 3 มาระเหยจนเกือบแห้งทำให้เย็น หยดแอซิติกแอนไฮไดรด์ 3 หยด เขย่าแล้วค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปข้าง ๆ หลอด 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์

การทดสอบฟลาโวนอยด์ ใช้ปฏิกิริยาไซยานิดิน (cyanidin reaction) ถ้ามีฟลาโวนจะให้สีส้มถึงแดง ถ้าเป็นฟลาโวนอล (flavonol) ให้สีแดงถึงแดงเลือดนก ถ้าเป็นฟลาวาโนน (flavanone) ให้สีแดงเลือดนกถึงแดงม่วง ในกรณีที่มีสีเมื่อใส่ชิ้นแมกนีเซียมให้เติมน้ำแล้วสกัดด้วยออกทานอล ถ้าเป็นไกลโคนจะให้สีในชั้นน้ำ ถ้าเป็นอไกลโคนจะให้สีในชั้นออกทานอล ถ้าเป็นลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanin) เมื่อต้มสารสกัดเมทานอลกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจะให้สีม่วงแดง

วิธีการทดลอง

นำสารสกัดมา 1 กรัม สกัดด้วยบิวตรเลียมอีเทอร์เพื่อกำจัดไขมันออก นำส่วนที่เหลือมาละลายในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แบ่งเป็น 3 หลอด ให้หลอดที่ 1 เป็นหลอดเปรียบเทียบ

การทดสอบไซยานิดิน นำหลอดที่ 2 มาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมแมกนีเซียม 1-2 ชิ้น สังเกตการเปลี่ยนสี เติมน้ำและออกทานอลจำนวน 2 และ 9 ลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ เขย่าหลอดแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การทดสอบลิวโคแอนโทไซยานิน นำหลอดที่ 3 มาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นบนหม้ออังไอน้ำ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2.4 การตรวจสอบซาโปนิน

การตรวจสอบซาโปนินในพืชสมุนไพรใช้ 2 วิธีคือ การเกิดฟอง และปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี

ก. การเกิดฟอง ซาโปนินจะให้ฟองแบบรังผึ้งอย่างน้อย 30 นาที เมื่อเขย่าสารละลายซาโปนินในน้ำ ถ้าซาโปนินถูกไฮโดรไลส์จะมีตะกอนเกิดขึ้น

ข. ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี ทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด โดยทั่ว ๆ ไปถ้ามีสเตอรอยด์ซาโปนินจะให้สีน้ำเงิน หรือเขียวแกมน้ำเงิน ถ้ามีไตรเทอปิ-นอยด์ซาโปนิน (triterpenoid saponin) จะให้สีแดง ชมพู หรือม่วง

วิธีการทดลอง

ก. การทดสอบฟอง นำพืชแห้งบดละเอียด 100 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วต้มบนหม้ออังไอน้ำ 5 นาที กรองขณะร้อน ปล่อยให้เย็น เขย่าสารละลายอย่างแรง 1 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 โมล/ลูกบาศก์-เดซิเมตรจำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารละลายต้ม 5 นาที ปล่อยให้เย็นเขย่าแรง ๆ 1 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ข. การทดสอบสีด้วยปฏิกิริยาลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด นำสารสกัดมา 1 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกเจือจาง 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 15 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลง สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ กรอง ระเหยสารละลายในชามกระเบื้องให้งวดบนหม้ออังไอน้ำ ปล่อยให้เย็น เติมแอซิติกแอนไฮไดรด์ 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยดลงข้างภาชนะ เพื่อให้สารทั้งสองผสมกันช้า ๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2.5 การทดสอบคูมาริน

คูมารินเป็นสารที่มีโครงสร้างแบบเบนโซ-แอลฟาไพโรน เมื่อมีการทำปฏิกิริยากับเบส วงไพโรนจะเปิดออกได้เกลือหรือแอนไอออนของกรดออร์โท-ไฮดรอกซีซินนามิค (o-hydroxycinnamic acid) ซิส-ไอโซเมอร์ของสารนี้ไม่เรืองแสง เมื่อถูกแสงอุลตราไวโอเลต สารนี้จะเปลี่ยนเป็นทราน-ไอโซเมอร์ ซึ่งสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ จึงใช้สมบัตินี้ในการทดสอบ

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำพืชแห้งที่บดละเอียด 3 กรัม ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น คลุมปากขวดด้วยกระดาษกรอง ซึ่งทำให้ชื้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร แล้วปิดด้วยอลูมิเนียมบาง ๆ อีกชั้นหนึ่ง นำไปตั้งบนหม้ออังไอน้ำเป็นเวลา 30 นาที ยกแผ่นกระดาษกรองไปวางไว้ใต้แสงอุลตราไวโอเลต เป็นเวลาประมาณ 10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

3. <u>การแยกสารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล</u>

นำสารสกัดแต่ละชนิดมาทำโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง เพื่อหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนนำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะใช้อัตราส่วนสารสกัด : ซิลิกาเจลประมาณ 1:20 โดยน้ำหนัก ใช้เฮกเซนคลอโรฟอร์ม และเมทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับชะสาร โดยค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวชะเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาส่วนละ 100-250 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายที่ได้แต่ละส่วนไประเหยด้วยเครื่องกลั่นลดความดันจนเหลือประมาณ 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ถ้าไม่มีผลึกเกิดขึ้นต้องทำโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง เพื่อรวมส่วนที่เหมือนกัน แล้วทำการแยกซ้ำด้วยคอลัมน์-โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม นำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ข้อมูลจากอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นิวเคลียร์แมกเนติก-เรโซเนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ และแมสสเปกโทรมิเตอร์

4. <u>เครื่องมือวิเคราะห์โครงสร้างสาร</u>

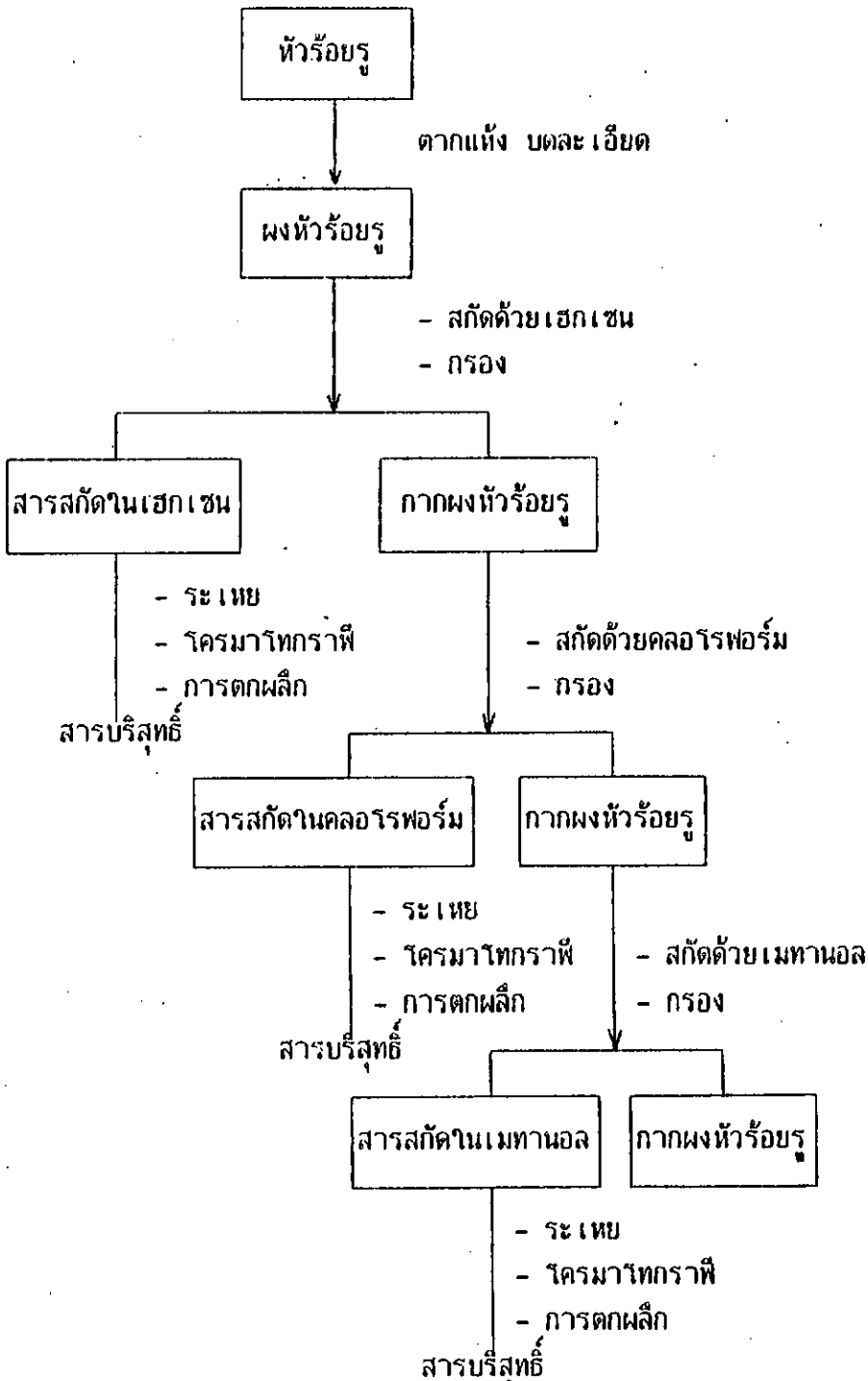
อินฟราเรดสเปกตรัม บันทึกข้อมูลโดยใช้เครื่อง Beckman Acculab-3

^{13}C-NMR และ ^{1}H-NMR บันทึกข้อมูลโดยใช้เครื่อง Varian XL-300 MHz spectrometer และ Varian 360L - 60 MHz

แมสสเปกตรัม บันทึกข้อมูลโดยใช้เครื่อง Finnigon 4021 (data system Incos 2100) spectrometer

จุดหลอมเหลวสารหาโดยใช้เครื่องมือ electrothermal Melting Point Apparatus

ขั้นตอนการสกัด การแยก การทำสารจากหัวร้อยรูให้บริสุทธิ์



ภาพประกอบ 2 แผนภูมิแสดงการสกัด การแยก และการทำสารจากหัวร้อยรูให้บริสุทธิ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. <u>ผลการสกัดสารจากหัวร้อยรู</u>

ในการสกัดสารจากหัวร้อยรู 4 กิโลกรัม โดยแช่ในตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอลตามลำดับ ได้สารสกัดเฮกเซน 30.5 กรัม สารสกัดคลอโรฟอร์ม 37.3 กรัม และสารสกัดเมทานอล 93.5 กรัม

2. <u>ผลการทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสารประกอบอินทรีย์</u>

2.1 <u>ผลการทดสอบอัลคาลอยด์</u>

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์ ใช้ปฏิกิริยาของอัลคาลอยด์กับรีเอเจนต์ที่ให้ตะกอนชัดเจน ได้แก่ ดราเจนดอร์ฟ แวกเนอร์ และมาร์มรีเอเจนต์ ผลการทดสอบดังตาราง 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์

รีเอเจนต์	สารสกัดเฮกเซน	สารสกัดคลอโรฟอร์ม	สารสกัดเมทานอล
ดราเจนดร์อฟ	-	+	++
แวกเนอร์	-	+	+++
มาร์ม	-	-	+

หมายเหตุ +++ หมายถึง ตะกอนมาก ++ หมายถึง ตะกอนน้อย
+ หมายถึง สารละลายขุ่น - หมายถึง ไม่มีตะกอน

ผลการทดสอบ แสดงว่าไม่มีอัลคาลอยด์ในสารสกัดเฮกเซน มีอัลคาลอยด์ปริมาณน้อยมากในสารสกัดคลอโรฟอร์ม และมีอัลคาลอยด์อยู่บ้างในสารสกัดเมทานอล

2.2 ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในพืชโดยวิธีทางเคมีที่ให้ผลค่อนข้างแน่นอน ควรใช้รีเอเจนต์ หรือปฏิกิริยาที่มีผลต่อองค์ประกอบสำคัญทั้ง 3 ส่วนของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ ส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ วงแลคโตน และน้ำตาลดีออกซี ผลการทดสอบแสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ปฏิกิริยา	ผลการทดสอบ		
	สารสกัดเฮกเซน	สารสกัดคลอโรฟอร์ม	สารสกัดเมทานอล
ก. ทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์	สารละลายให้สีน้ำตาลปนเขียว	สารละลายให้สีน้ำเงินปนเขียว	สารละลายให้สีน้ำตาลปนเขียว
ข. ทดสอบส่วนที่เป็นวงแลคโทน	ให้สารละลายสีม่วง	ให้สารละลายสีน้ำตาล	ให้สารละลายสีเหลืองปนม่วง
ค. ทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาล	เกิดวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียวอ่อน	เกิดวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้น ไม่ให้สีเขียวชั้นบน	เกิดวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้น ชั้นบนให้สารละลายสีเขียวอ่อน

ผลการทดสอบ แสดงว่า มีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในสารสกัดเฮกเซนและเมทานอล และส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ในสารสกัดคลอโรฟอร์ม

2.3 ผลการทดสอบฟลาโวนอยด์

การทดสอบฟลาโวนอยด์ ใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน กับลิวโคแอนโทไซยานิน ให้ผลการทดสอบดังตาราง 3

ตาราง 3 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์

ปฏิกิริยา	ผลการทดสอบจากสารสกัดเมทานอล
ไซยานิดิน	ชั้นออกทานอลมีสีน้ำตาลแดงถึงแดงเลือดหมู ชั้นน้ำให้สีส้ม
ทดสอบสารลิวโคแอนโทไซยานิน	ให้สารละลายสีม่วงแดง

หมายเหตุ สารสกัดเฮกเซน และสารสกัดคลอโรฟอร์ม ไม่สามารถทดสอบได้ เนื่องจากสารสกัดละลายในชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์

ผลการทดสอบ แสดงว่า มีฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเมทานอล

2.4 ผลการทดสอบซาโปนิน

การทดสอบซาโปนินใช้การทดสอบ 2 วิธี คือการทดสอบฟอง และการทดสอบสีโดยใช้ปฏิกิริยาลีเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด ผลการทดสอบซาโปนินแสดงไว้ในตาราง 4

ตาราง 4 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน

การทดสอบฟองกับผงหัวร้อยรู	การทดสอบลีลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด		
	สารสกัดเฮกเซน	สารสกัดคลอโรฟอร์ม	สารสกัดเมทานอล
เกิดฟองสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และคงอยู่นาน 30 นาที	สารละลายสีน้ำตาลปนเขียว	สารละลายสีน้ำตาลปนเขียวเข้ม	สารละลายสีเหลืองปนเขียวอ่อน

ผลการทดสอบ แสดงว่า มีซาโปนินในสารสกัดเฮกเซน สารสกัดคลอโรฟอร์ม และสารสกัดเมทานอล

2.5 ผลการทดสอบคูมาริน

การทดสอบคูมาริน โดยการสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ให้ผลการทดสอบดังนี้

ผลการทดสอบ ไม่เกิดการเรืองแสงที่บริเวณกระดาษกรอง แสดงว่าไม่มีคูมารินในหัวร้อยรู

3. ผลการแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์

3.1 ผลการแยกสารสกัดเฮกเซน

ในการนำสารสกัดเฮกเซนหนัก 10.2 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ยาว 90 เซนติเมตร โดยใช้ซิลิกาเจล 300 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับ ความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ร้อยละ 10,20,40,50 และ 70 (โดยปริมาตร) คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ร้อยละ 20,40,60 และ 80 (โดยปริมาตร) และเมทานอลตามลำดับ

เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วย โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่หมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 5

ตาราง 5 ผลการแยกสารสกัดเฮกเซนโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์		ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
เฮกเซน		1-5	สารคล้ายขี้ผึ้งปนน้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน	ร้อยละ 10	6-11	สารคล้ายขี้ผึ้งปนน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
	ร้อยละ 20	12-18	คราบน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
	ร้อยละ 40	19-20	สารคล้ายขี้ผึ้งสีขาว
	ร้อยละ 50	21-30	สารคล้ายขี้ผึ้งผสมกับน้ำมันสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 70	31-38	สารคล้ายขี้ผึ้งปนกับน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
คลอโรฟอร์ม		39-41	สารเหนียวสีเขียวปนกับผลึกรูปเข็ม
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม	ร้อยละ 20	42-48	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 40	49-52	สารคล้ายน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
	ร้อยละ 60	53-60	คราบสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 80	61-67	สารแข็งสีน้ำตาลปริมาณน้อยมาก
เมทานอล		68-72	สารสีน้ำตาลปนตะกอนขาว

นำสารส่วนที่ 39-41 ซึ่งมีผลึกรูปเข็มอยู่หนัก 7.0702 กรัม มาทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ต่อโดยใช้คอลัมน์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 85 เซนติเมตร โดยใช้ซิลิกาเจล 130 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม

ร้อยละ 20,30,40 และ 60 โดยปริมาตร เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำส่วนที่เหมือนกันมารวมกัน โดยวิธีดังกล่าวมาแล้ว ได้ผลดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการแยกสารสกัดเฮกเซนจากการรวมลำดับส่วนที่ 39-41 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
คลอโรฟอร์ม	1-5	สารคล้ายขี้ผึ้งสีน้ำตาลอ่อน
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม ร้อยละ 20	6-13	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
ร้อยละ 30	14-16	สารเหนียวสีเขียวปนกับผลึกรูปเข็มสีขาว
ร้อยละ 40	17-21	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
ร้อยละ 60	22-47	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอ่อนปริมาณน้อยมาก

สารในลำดับส่วนที่ 14-16 ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว ตกผลึกซ้ำในเมทานอล ได้ผลึกหนัก 0.0902 กรัม จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส กำหนดให้เป็นสาร ก.

3.2 ผลการแยกสารสกัดคลอโรฟอร์ม

ในการนำสารสกัดคลอโรฟอร์มหนัก 21.3 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร ยาว 120 เซนติเมตร โดยใช้ซิลิกาเจล 400 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล

กับคลอโรฟอร์มร้อยละ 5,10,15,25,30,35,40,60 และ 80 (โดยปริมาตร) และเมทานอล ตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 7

ตาราง 7 ผลการแยกสารสกัดคลอโรฟอร์มด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
คลอโรฟอร์ม	1-3	คราบสีขาวคล้ายขี้ผึ้ง
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม ร้อยละ 5	4-6	เป็นขี้ผึ้งสีขาวปริมาณน้อย
ร้อยละ 10	7-17	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
ร้อยละ 15	18-32	ของแข็งสีเหลืองผสมน้ำมันสีเหลือง
ร้อยละ 25	33-41	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
ร้อยละ 30	42-45	สารเหนียวสีเหลืองเขียว
ร้อยละ 35	46-47	น้ำมันเหนียวสีเหลืองน้ำตาล
ร้อยละ 40	48-51	ของแข็งสีน้ำตาลปนเขียวปริมาณน้อย
ร้อยละ 60	52-66	ของแข็งสีน้ำตาลปริมาณน้อย
ร้อยละ 80	67-80	ของแข็งสีน้ำตาลเข้มปริมาณน้อย
เมทานอล	81-116	สารสีน้ำตาลปนตะกอนขาว

นำสารลำดับส่วนที่ 42-45 ซึ่งเป็นส่วนที่มีปริมาณมากหนัก 4.075 กรัม ละลายด้วยเอทิลอะซิเตตนำไปอุ่นได้ผลึกรูปเข็มสีขาวตกผลึกซ้ำด้วยร้อยละ 50 ของเอทิลอะซิเตตกับคลอโรฟอร์มได้ผลึกหนัก 0.0696 กรัม กำหนดให้เป็นสาร ข. นำส่วนที่เหลือจากการตกผลึกระเหยตัวทำละลายออกแล้วนำมาละลายด้วยเมทานอล ตั้งทิ้งไว้ได้ผลึกสีขาวเป็นเกล็ดบาง นำมาตกผลึก

173074

ชำด้วยเมทานอลได้ผลึกหนัก 0.0054 กรัม กำหนดให้เป็นสาร ค. นำส่วนที่เหลือจากการตกผลึกเอาสาร ค. ออกซึ่งหนัก 4.0 กรัม มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ยาว 90 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 120 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนร้อยละ 10,20,30,40,50,60,70 และ 80 (โดยปริมาตร) คลอโรฟอร์มตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ร้อยละ 10, 15,20,25 และ 30 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 ลูกบาศก์-เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์-เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 8

ตาราง 8 ผลการแยกสารส่วนที่เหลือจากการตกผลึกสาร ค. ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์		ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
เฮกเซน		1-43	ไม่มีสาร
คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน	ร้อยละ 10	44-56	คราบสีขาว
	ร้อยละ 20	57-62	สารคล้ายขี้ผึ้งสีขาวปริมาณน้อยมาก
	ร้อยละ 30	63-82	สารสีขาวปนเหลืองปริมาณน้อย
	ร้อยละ 40	83-95	คราบสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 50	96-109	คราบสีเหลือง
	ร้อยละ 60	110-119	สารสีเหลืองปริมาณน้อย
		120-123	สารสีเหลืองปนน้ำเงิน
	ร้อยละ 70	124-128	สารสีเหลืองปนคราบสีขาว
		129-139	คราบสีเหลือง

ตาราง 8 (ต่อ)

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
ร้อยละ 80	140-145	คราบสีเหลืองอ่อน
ร้อยละ 90	146-149	คราบสีเหลืองอ่อน
คลอโรฟอร์ม	150-152	คราบสีขาว
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม ร้อยละ 10	153-154	คราบสีเขียวอ่อน
	155-163	สารสีเขียวปนดำ
ร้อยละ 15	164-167	คราบสีขาว
ร้อยละ 20	168-175	คราบสีเหลือง
ร้อยละ 25	176-178	สารสีเหลืองปริมาณน้อย
ร้อยละ 30	179-182	คราบสีเหลือง

จากตาราง 8 จะเห็นได้ว่าสารในแต่ละลำดับส่วนที่แยกได้ส่วนมากมีสีเหลืองหรือเหลืองปนน้ำมันปริมาณน้อย ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้

3.3 ผลการแยกสารสกัดเมทานอล

จากการนำสารสกัดเมทานอลหนัก 30 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 120 เซนติเมตร โดยใช้ซิลิกาเจล 600 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 10,15,30 และ 60 (โดยปริมาตร) เมทานอล เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 9

ตาราง 9 ผลการแยกสารสกัดเมทานอลด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
คลอโรฟอร์ม	1-25	ไม่มีสาร
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม ร้อยละ 10	26-36	สารเหนียวสีน้ำตาลปนเหลือง
ร้อยละ 15	37-38	สารเหนียวสีน้ำตาลปนเขียว
ร้อยละ 30	39-54	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อนปริมาณน้อย
ร้อยละ 60	55-86	สารสีน้ำตาลเข้มบนเกล็ดสีน้ำตาล มีลักษณะมันวาว
เมทานอล	87-97	คราบสีน้ำตาลปริมาณเล็กน้อย

จากตาราง 9 จะเห็นได้ว่าสารในแต่ละลำดับส่วน เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลปริมาณไม่มาก ทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก แต่มีลำดับส่วนที่ 55-86 ซึ่งมีสารสีน้ำตาลเข้มบนเกล็ดสีน้ำตาลมีลักษณะมันวาว หนัก 14.7160 กรัม นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ต่อ โดยใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 120 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 420 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 5,10,15,20,25,30, 40,50,60,70 และ 80 (โดยปริมาตร) และเมทานอลตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 10

ตาราง 10 ผลการแยกสารจากการรวมลำดับส่วน 55-86 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
คลอโรฟอร์ม	1-14	ไม่มีสาร
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม ร้อยละ 5	15-29	ไม่มีสาร
ร้อยละ 10	30-34	คราบน้ำมันสีเหลือง
ร้อยละ 15	35-85	คราบสีน้ำตาลเข้ม
	86-101	สารสีน้ำตาลปริมาณน้อย
ร้อยละ 20	102-111	คราบสีน้ำตาล
ร้อยละ 30	112-142	สารสีน้ำตาล ผลึกสี่เหลี่ยมสีขาว
ร้อยละ 40	143-150	สารสีน้ำตาลปริมาณน้อย
ร้อยละ 50	151-168	สารสีน้ำตาลปนผงสีดำ
ร้อยละ 60	169-181	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
	182-189	คราบสีน้ำตาลอ่อน
ร้อยละ 70	190-203	คราบสีน้ำตาลเข้ม
ร้อยละ 80	204-213	คราบสีน้ำตาลอ่อน
เมทานอล	214-226	คราบสีน้ำตาลอ่อน

ผลการแยกสารในตาราง 10 สารที่แยกได้ส่วนมากมีปริมาณน้อย แต่มีลำดับส่วนที่ 112-142 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วยร้อยละ 30 ของเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ได้ผลึกรูปสี่เหลี่ยมสีขาว ตกผลึกซ้ำในน้ำกลั่น ได้ผลึกหนัก 4.1292 กรัม กำหนดให้เป็นสาร ง.

4. การวิเคราะห์สาร

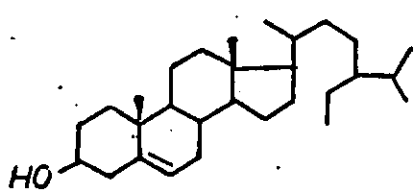
4.1 การวิเคราะห์สาร ก. (จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส) สาร ก. ละลายได้ดีใน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เอทิลอะซิเตต ละลายได้บ้างในเมทานอล ให้ผลสีน้ำเงินกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมน - เบอร์ชาร์ด มีค่า Rf 0.46 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า $\int_{max}^{KBr}$ (cm^{-1}) 3400 (การยืด O-H), 2950 (การยืด C-H ของ $-CH_3$ และ CH_2), 1460 (การยืด CH_2), 1380 (การยืด C-C), 1050-960 (การยืด C-O) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 3 ในภาคผนวก

^{1}H-NMR สเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ(ppm) 0.68-2.30 (-CH, $-CH_2$,$-CH_3$), 3.5 (-OH) และ 5.35 (C=CH) ปรากฏสเปกตรัม ดังภาพประกอบ 4 ในภาคผนวก

แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e 414(M^+), 396,381,329,303,273,255 และ 213 ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 5 ในภาคผนวก

จากสมบัติของสาร ก. ได้แก่ จุดหลอมเหลว การละลาย การทำปฏิกิริยาลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด และจากสเปกตรัมของสาร ก. ทำให้สรุปได้ว่า สาร ก. คือ เบต้า-ไซโตส-เตอรอล ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{50}O$ และสูตรโครงสร้างคือ



เบต้า-ไซโตสเตอรอล

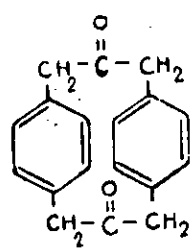
4.2 การวิเคราะห์สาร ข. (สลายตัวที่ 170-268 องศาเซลเซียส) สาร ข. ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเอทิลอะซิเตต เมทานอล และเฮกเซน มีค่า Rf = 0.7 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3100 (อะโรมาติก C-H) 2930 (อะลิฟาติก C-H) 1720 (การยืด C=O) 1450 (การยืด C=C อะโรมาติก) 1300-1250 (การยืด C-O) 730 (การงอ =CH) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 8 ในภาคผนวก

^{1}H-NMR สเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 4.68 ($-CH_2-$) 8.10 (โปรตอนของอะโรมาติก) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 9 ในภาคผนวก

^{13}C-NMR สเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 62.74 ($-CH_2-$), 129.73 ($-\overset{|}{C}H-$); 133.79 ($-\overset{|}{\underset{|}{C}}-$), 165.27 (C=O) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 10-11 ในภาคผนวก

เนื่องจากสาร ข. มีปริมาณน้อยไม่สามารถทดสอบยืนยันโครงสร้างได้ แต่เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมแล้วพอจะคาดได้ว่าสาร ข. อาจเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคีโตน มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{16}O_2$ และสูตรโครงสร้างคือ



สูตรโครงสร้างของสาร ข.

4.3 การวิเคราะห์สาร ค. (จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส) สาร ค. ละลายได้ดีใน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เอทิลอะซิเตต ละลายได้บ้างในเมทานอล และมีค่า Rf 0.46 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3400 (การยืด O-H), 2950 (การยืด C-H ของ $-CH_3$ และ CH_2), 1460 (การยืด CH_2), 1380 (การยืด C-C), 1050-960 (การยืด C-O) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 12

^{1}H-NMR สเปกตรัม (60 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 0.68-2.30 (-CH, $-CH_2$, $-CH_3$), 3.5 (-OH) และ 5.35 (>C=CH) ปรากฏสเปกตรัม ดังภาพประกอบ 13 ในภาคผนวก

แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e 414(M^+),396,381,329,303,273,255 และ 213 ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 14 ในภาคผนวก

จากสมบัติของสาร ค. ได้แก่ จุดหลอมเหลว การละลาย และจากสเปกตรัมของสาร ค. ทำให้สรุปได้ว่าสาร ค. คือ เบต้า-ไซโตสเตอรอล เหมือนกับสาร ก.

4.4 <u>การวิเคราะห์สาร ง.</u> (จุดหลอมเหลวสูงมาก) ละลายได้ดีในน้ำไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ดูดกลืนแสงอินฟราเรด นำมาทดสอบแคทไอออน และแอนไอออนโดยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ (Vogel 1968) เกิดตะกอนสีขาวของซิลเวอร์คลอไรด์ เมื่อทดสอบกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ได้ตะกอนสีเหลืองของโปแตสเซียมเฮกซะไนโตรโคบอลเตต (Potassium hexanitrocobaltate) เมื่อทดสอบกับสารละลายโซเดียมเฮกซะไนโตร-โคบอลเตต (Sodium hexanitrocobaltate) ได้ตะกอนละเอียดเป็นผงสีเหลืองของซิงค์ยูรานิลโซเดียมอะซิเตต (Zinc uranyl sodium acetate) เมื่อทดสอบกับสารละลายซิงค์ยูรานิลอะซิเตต (Zinc uranyl acetate) ส่วนแคทไอออน และแอนไอออนชนิดอื่นตรวจไม่พบ จากการทดสอบกับรีเอเจนต์ดังกล่าวข้างต้น การละลาย และจุดหลอมเหลวทำให้สรุปได้ว่าสาร ง. เป็นเกลือคลอไรด์ของโซเดียม และโปแตสเซียม

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผล

การสกัดสารจากหัวร้อยรู้แห้งบดละเอียดด้วย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล แล้วนำผลสกัดมาทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ในสารสกัดเฮกเซน พบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซาโปนิน และพบอัลคาลอยด์เล็กน้อย ในสารสกัดคลอโรฟอร์มพบซาโปนิน และมีอัลคาลอยด์อยู่บ้าง ส่วนในสารสกัดเมทานอลพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน เมื่อแยกสารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ในสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดคลอโรฟอร์ม พบเบต้า-ไซโตสเตอรอล นอกจากนี้ในสารสกัดคลอโรฟอร์มยังพบสารประกอบคีโตนมีสูตร $C_{18}H_{16}O_2$ ส่วนสารสกัดเมทานอลพบเกลือคลอไรด์ของโซเดียมและโปแตสเซียม

อภิปรายผล

ในการแยกสารสกัดเฮกเซน และคลอโรฟอร์มพบสาร ก. และสาร ค. ตามลำดับ สารทั้งสองมีจุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส สาร ก. ให้สีน้ำเงินกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด แสดงว่าเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ สาร ก. และสาร ค. มีข้อมูลทางสเปกตรัมเหมือนกันคือ มีค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันคือ 3400 (การยืด O-H), 2950 (การยืด C-H ของ $-CH_3$ และ $-CH_2$), 1460 (การยืด CH_2), 1380 (การยืด C-C), 1050-960 (การยืด C-O), ^{1}H-NMR สเปกตรัม (300 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 0.68-2.30 (-CH, $-CH_2$, $-CH_3$), 3.5 (-OH) และ 5.35 ($>C=CH$) แมสสเปกตรัม แสดงค่า m/e ได้ M^+ 414 ($C_{29}H_{50}O$), 396 (M^+-H_2O), 381 (M^+-CH_5O), 329 ($M^+-C_5H_9O$), 303 ($M^+-C_7H_{11}O$), 273 ($M^+-C_{10}H_{21}$), 255 ($M^+-C_{10}H_{23}O$), 213 ($M^+-C_{13}H_{29}O$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับจุดหลอมเหลวและสเปกตรัมมาตรฐานของเบต้า-ไซโตสเตอรอล (ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 6,7

ในภาคผนวก) คาดว่าสาร ก. และสาร ค. คือ เบต้า-ไซโตสเตอรอล สำหรับสารสกัดคลอโรฟอร์มพบสารอีกชนิดหนึ่งคือ สาร ข. สารนี้สลายตัวที่ 170-268 องศาเซลเซียส เนื่องจากปริมาณสารมีน้อยไม่สามารถทดสอบยืนยันโครงสร้างได้ ข้อมูลทางสเปกตรัมที่ปรากฏคือ มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่แสดงหมู่ฟังก์ชันคือ 1720 cm^{-1} (การยืด C=O) ^{1}H-NMR สเปกตรัม (300 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 4.68 ($-CH_2-$), 8.10 (โปรตอนของอะโรมาติก) ^{13}C-NMR สเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 62.74 ($-CH_2-$), 129.73 ($-\dot{C}H$), 133.79 ($-\dot{C}-$), 165.27 (C=O) จากการพิจารณาข้อมูลทางสเปกตรัม จะเห็นว่าสาร ข. มีหมู่ฟังก์ชันเป็นคีโตน จาก ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR คาดได้ว่ามีวงเบนซีนและมีหมู่เมทิลีน จำนวนโปรตอนในวงเบนซีนอยู่ในสภาวะเดียวกัน และมีจำนวนเท่ากับโปรตอนของหมู่เมทิลีน ส่วน ^{13}C-NMR แสดงคาร์บอนของหมู่คาร์โบนิลเมทิลีน และคาร์บอนของวงอะโรมาติก ดังนั้นพอจะคาดได้ว่าสาร ข. เป็นสารประกอบคีโตน มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{18}H_{16}O_2$

ในสารสกัดเมทานอลพบสาร ง. มีจุดหลอมเหลวสูงมาก ละลายน้ำได้ดี ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จากการทดสอบกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตได้ตะกอนขาวของซิลเวอร์คลอไรด์ ซึ่งละลายได้ดีในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ แสดงว่ามีคลอไรด์ ทดสอบกับสารละลายโซเดียมเฮกซะไนโตรโคบอลเตต ได้ตะกอนสีเหลืองของโปแตสเซียมเฮกซะไนโตรโคบอลเตต แสดงว่ามีโปแตสเซียมอิออน ทดสอบกับสารละลายซิงค์ยูรานิลอะซิเตต ได้ตะกอนเป็นผงสีเหลืองของซิงค์ยูรานิลโซเดียมอะซิเตต แสดงว่ามีโซเดียมอิออน แคทอิออนและแอนอิออนชนิดอื่นตรวจไม่พบ จากการทดสอบสาร ง. ด้วยรีเอเจนต์ ทำให้สรุปได้ว่าสาร ง. เป็นเกลือ-คลอไรด์ของโซเดียมและโปแตสเซียม

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

นพรัตน์ พัฒนเจิน. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพรบางชนิด. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2527.

ปราโมทย์ ศรีภิรมย์. ชุมนุมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์หอสมุดกลาง 09, 2524.

สุภาพ บุณยะรัตเวช. "การทดสอบประเภทของสารเคมีในพืชสมุนไพรไทย," รายงานผลการวิจัย. หน้า 117-141. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2523.

สุภาลักษณ์ บรัชชญาสิทธิกุล และเชนโด ริยชัดา. "การวิเคราะห์ธาตุในสมุนไพรโดย Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry," วิทยาศาสตร์ มศว. 4(1) : 31-35 ; มิถุนายน 2531.

สมบัติ พุ่มสาขา. การศึกษาผลของสมุนไพรต่อหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยแอลลอกแซน. ปริญญานิพนธ์ กศม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

อนันต์ ตั้งทองคำ. การศึกษาสารประกอบทางอนินทรีย์เคมี ในหมากดิบน้ำค้างและต้นเหงือกปลาหมอ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2521. อัดสำเนา.

Desilva, L.B. and others. "An Iridoid Glycoside from Wendlandia Bicuspidata, " Journal of Natural Products. 50(6) : 1184 ; November, 1987.

Farnsworth, N.R. "Biological and Phytochemical Screening of Plant, " Journal of Pharmaceutical Sciences. 55(3) : 243-267 ; March, 1966.

Gissman, T.A. Chemistry of the Flavonoid Compounds. Oxford : Pergamon Press. 1962.

Handa, Sukhdev S. and others. " NMR Spectral Analysis of Cadambine from Anthocephalus chinensis, " Journal of Natural Products. 46(3) : 325-330 ; May/June, 1983

Harborne, J.B. Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of plant Analysis. 2nd ed. London : Chapman and Hall, 1984.

Inouye, Hiroyuki, Takeda Y-shio and Nishimura Hiroshi. " Two New Iridoid Glucosides from Gardenia Jasminoides Fruits, " Phytochemistry 13 : 2219-2224 ; February, 1974.

Mata, Rachel and others. " Chemical Studies on Maxima Plants Used in Traditional Medicine, 111 ; New 4-Phenyl coumarins from Exostema caribaeum, " Journal of Natural Products. 50(5) : 866-871 ; September/October, 1987.

Reher, Gesa and Lyubomir Kraus. " New Neoflavonoid from Cautaria latiflorla, " Journal of Natural Products. 47(1) : 172-174 ; January/February, 1984.

Vogel A.I. Macro and Semimicro. Qualitative Inorganic Analysis. Longmans Green & Co. London 1968.

Weigrebe, Walfgany and others. " The Emitine Alkaloids, " Journal of Natural Products. 47(3) : 397-408 ; May/June, 1984.

Windholz, M. and others. The Merck Index. 10th ed. U.S.A. : Merck & Co. ; INC, 1983.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบทางพฤกษเคมี

สารละลายที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์

1. ดราเจนดรอฟรีเอเจนต์

ละลายบิสมัทไนเตรต 8.0 กรัม ในกรดไนตริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 30 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 120 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วผสมกับสารละลายของโปแตสเซียม-ไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. มาร์มรีเอเจนต์

ละลายแคดเมียมไอโอไดด์ 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วผสมกับสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 20 กรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับสารละลายผสมนี้ให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. แวกเนอร์รีเอเจนต์

ละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมไอโอดีน 1.27 กรัม เมื่อละลายหมดแล้ว ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายที่ใช้ทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

1. เคดด์รีเอเจนต์

ละลายกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก 1 กรัม ในเมทานอล แล้วเติมเมทานอลให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. เฟอริกคลอไรด์รีเอเจนต์

ละลายเฟอริกคลอไรด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายนี้มา 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายที่ใช้ทดสอบเกลืออนินทรีย์

1. สารละลายที่ใช้ทดสอบคลอไรด์ไอออน

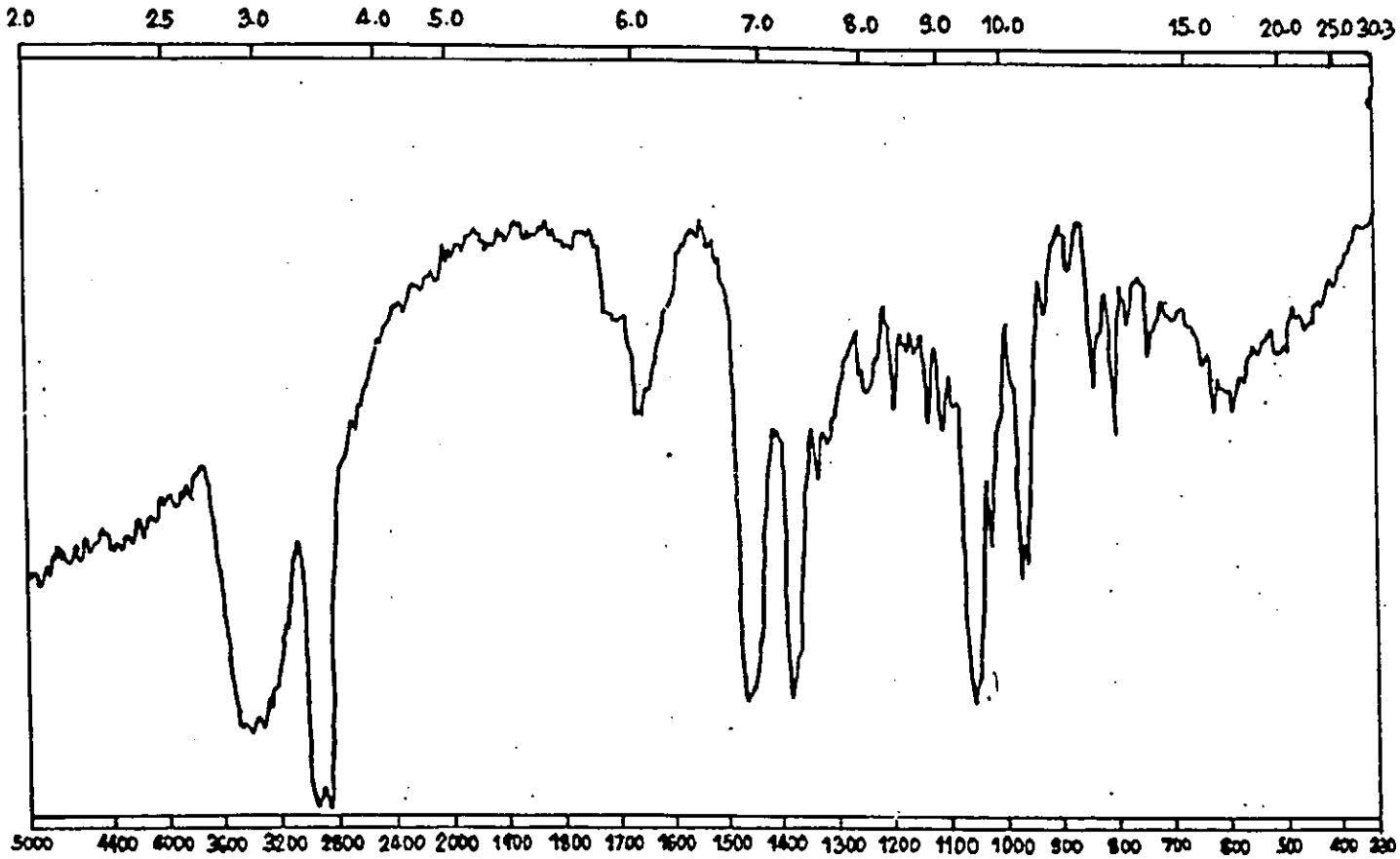
ละลายซิลเวอร์ไนเตรต 17.0 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. สารละลายที่ใช้ทดสอบโซเดียมไอออน

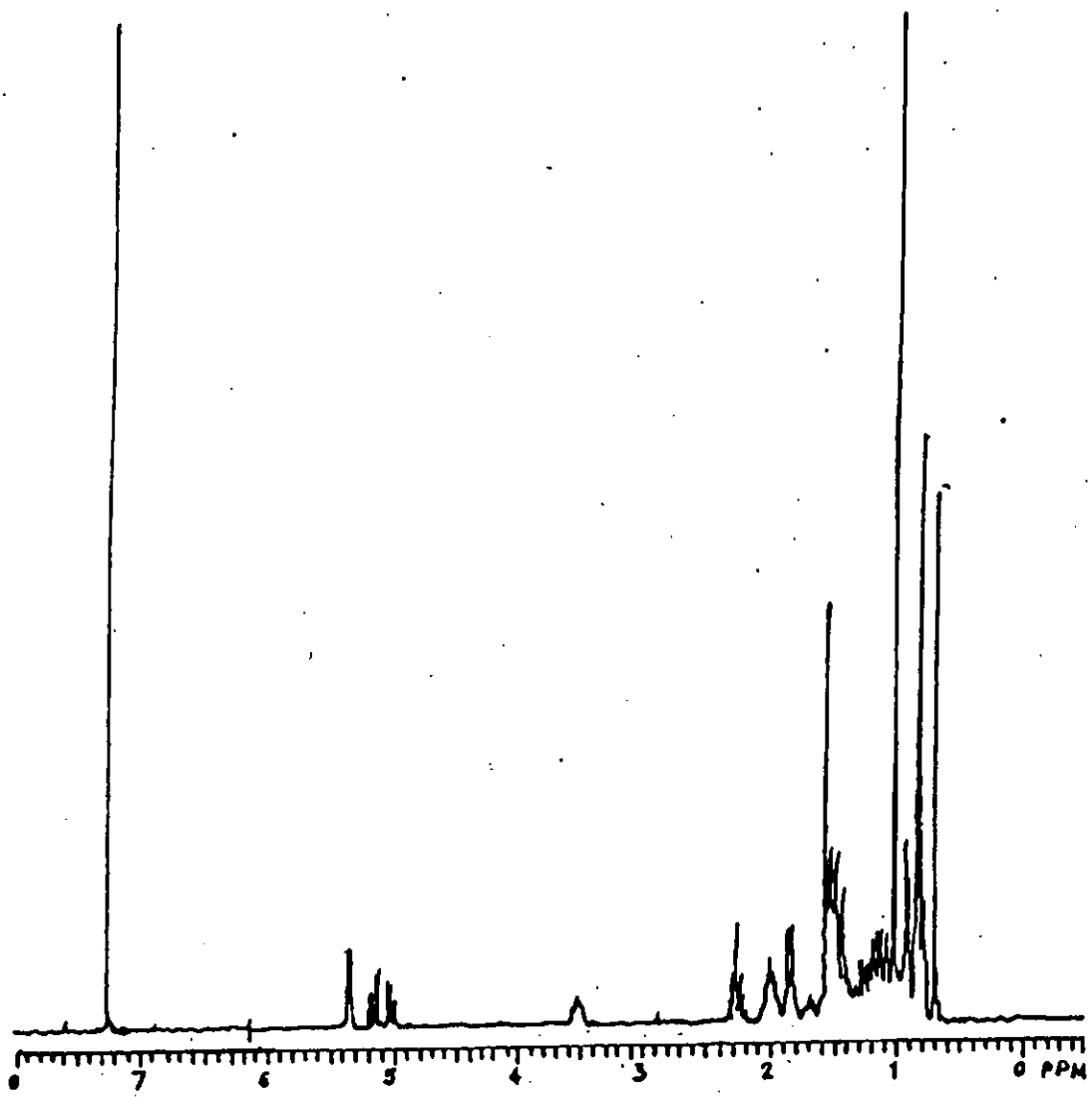
ละลายยูรานิลแอซิเตต 30 กรัม และซิงค์อะซิเตต 30 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับปริมาตรให้เป็น 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นและตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรอง

3. สารละลายที่ใช้ทดสอบโปแตสเซียมไอออน

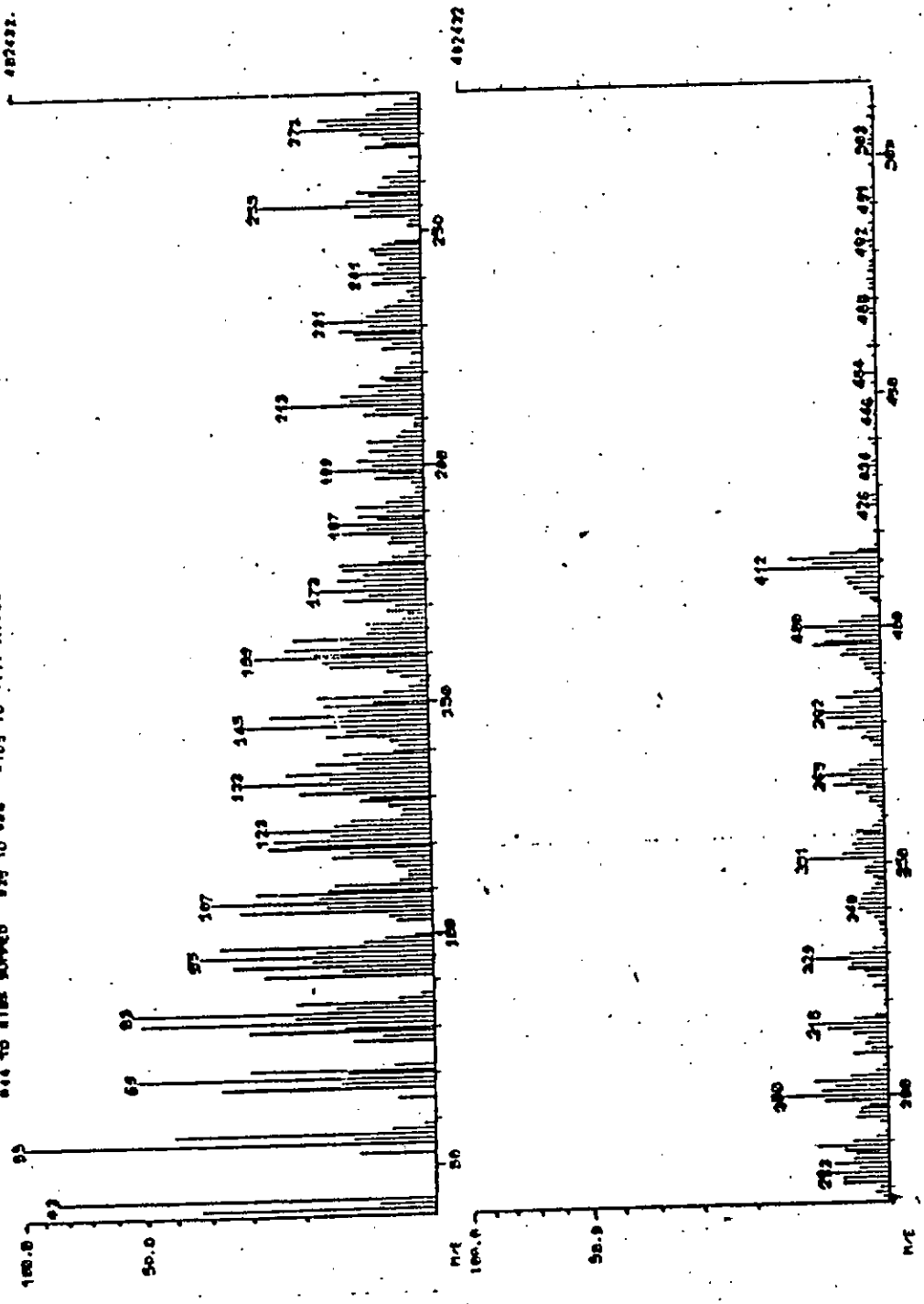
ละลายโซเดียมเฮกซะไนโตรโคบอลเตต 17 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร



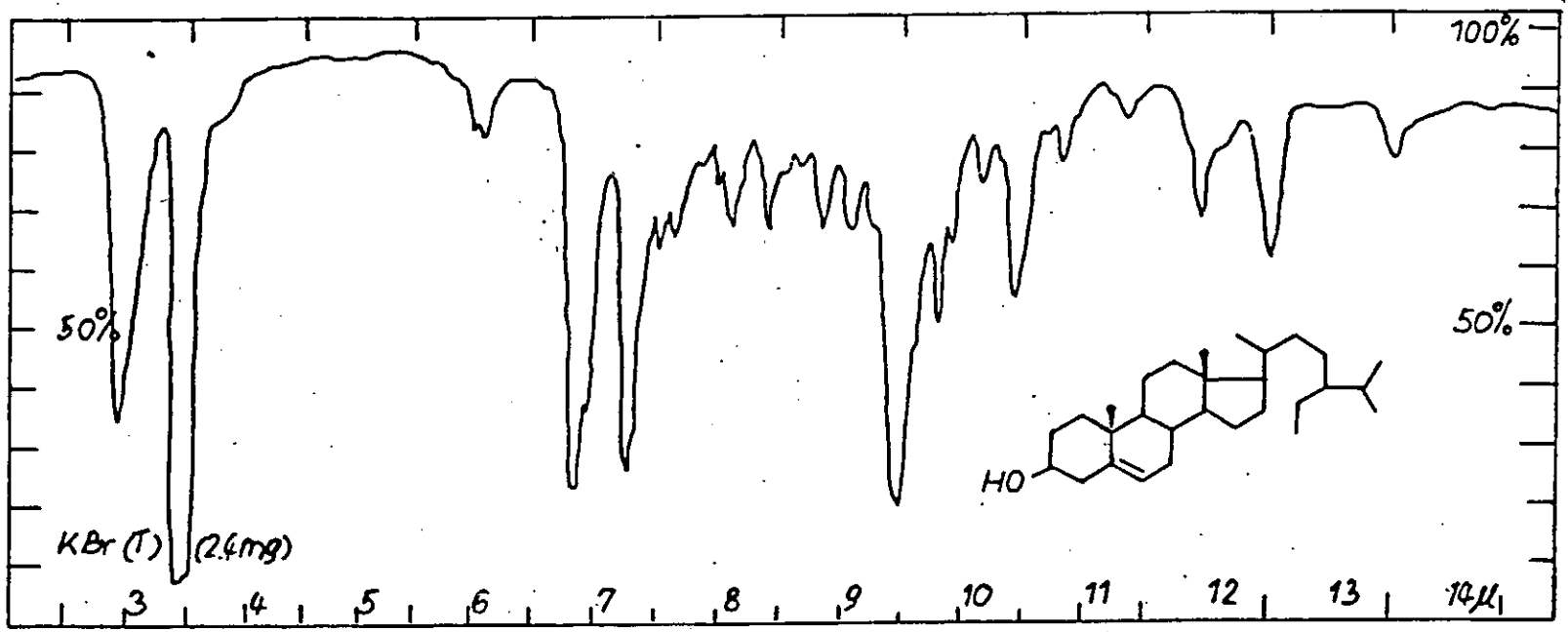
ภาพประกอบ 3 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร ก.



ภาพประกอบ 4 แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ ^{1}H-NMR (300 MHz_2, $CDCl_3$) ของสาร ก.

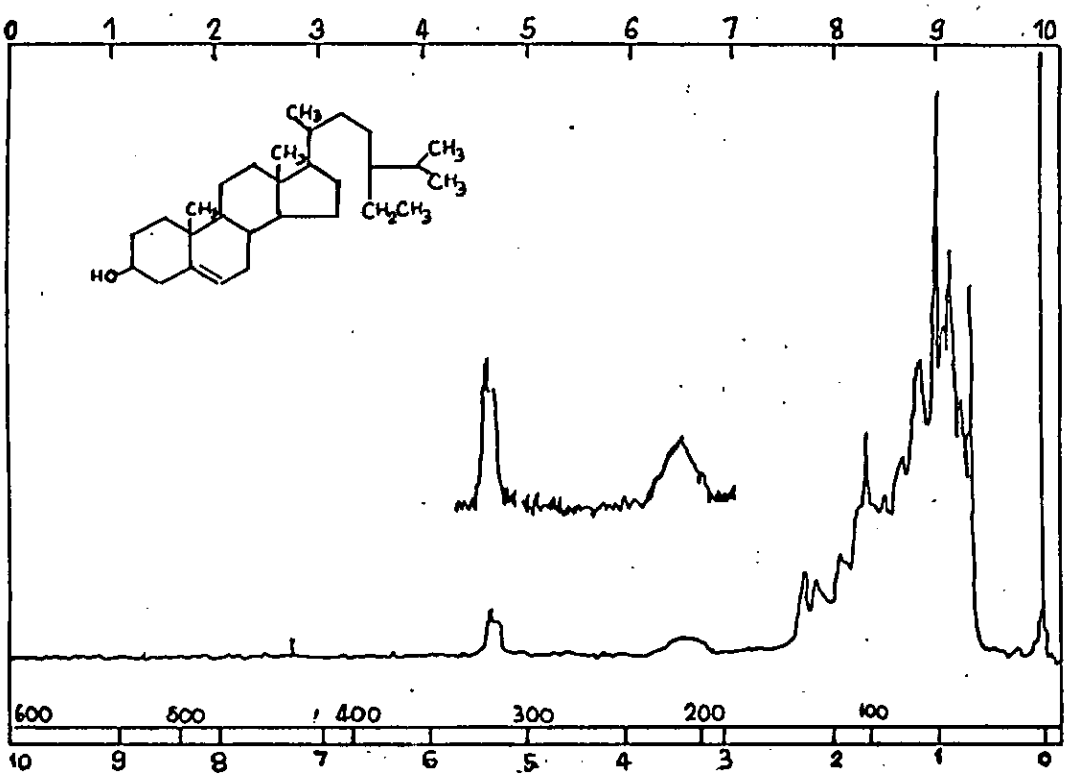


ภาพประกอบ 5 แสดงแมสสเปคตรัมที่วิเคราะห์ค่า m/e ของสาร ก.

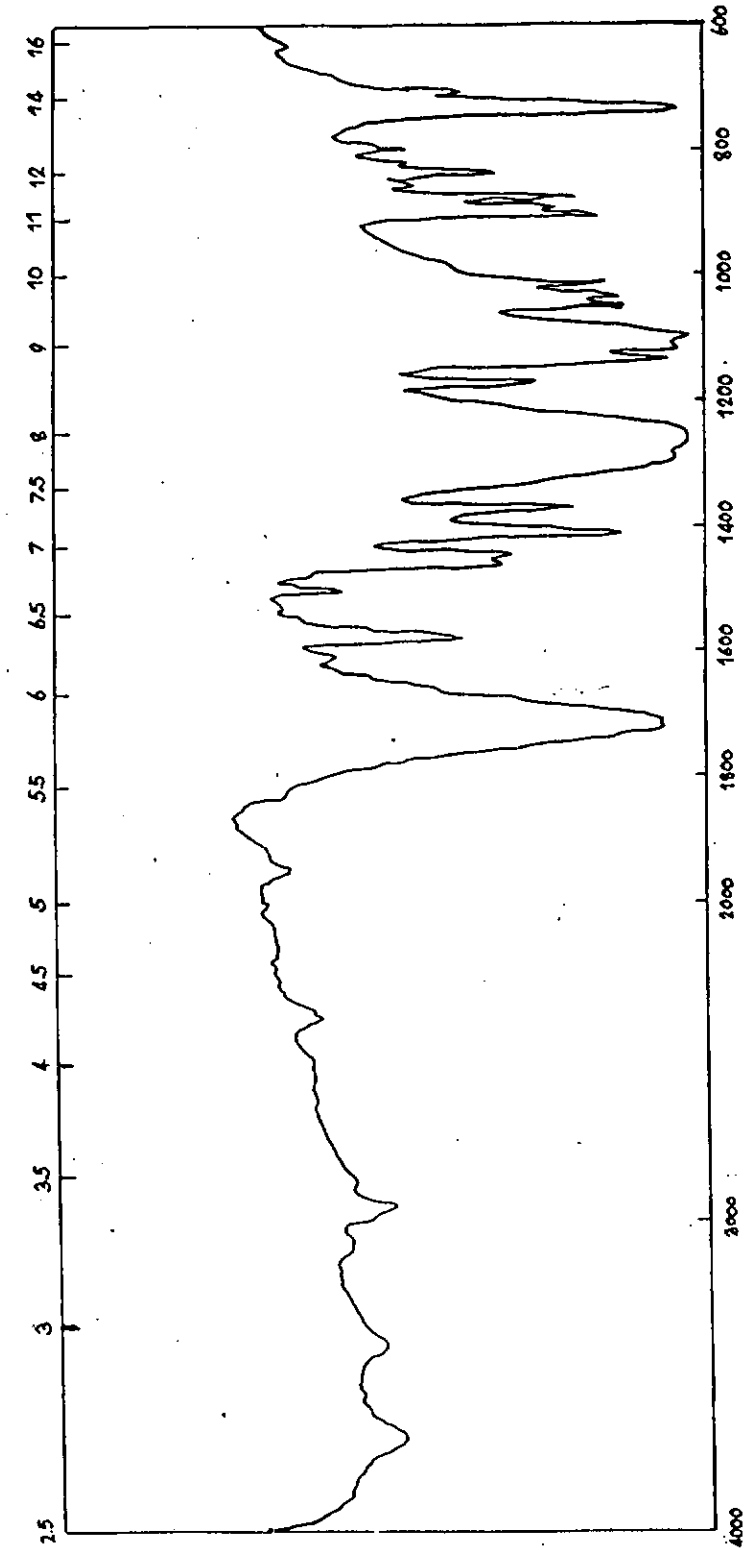


WAVELENGTH (μ)

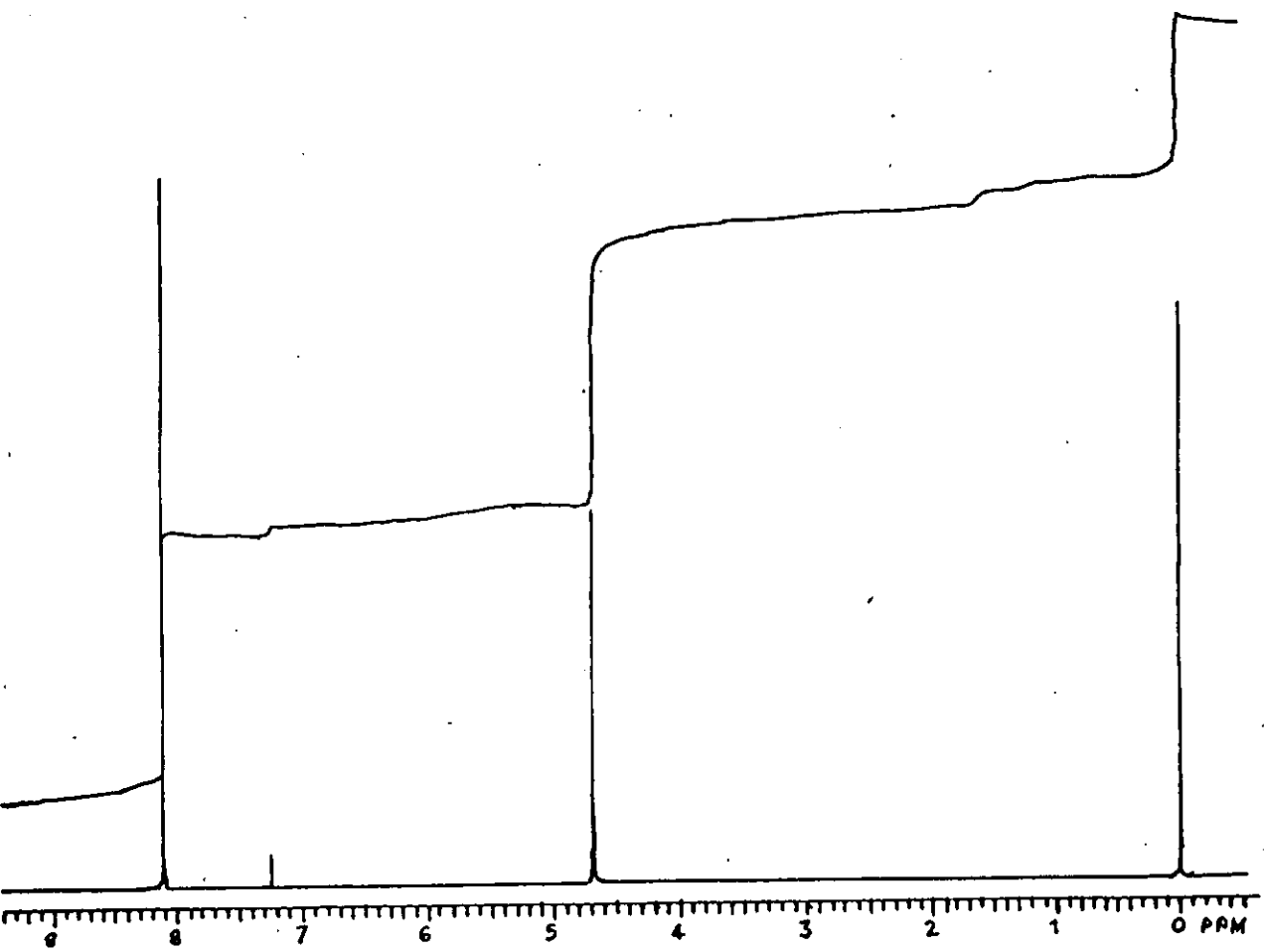
ภาพประกอบ 6 แสดงสเปกตรัมมาตรฐานการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของเบต้า-ไซโตสเตอรอล



ภาพประกอบ 7 แสดงสเปกตรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์ ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$) ของเบต้า-ไซโตสเตอรอล

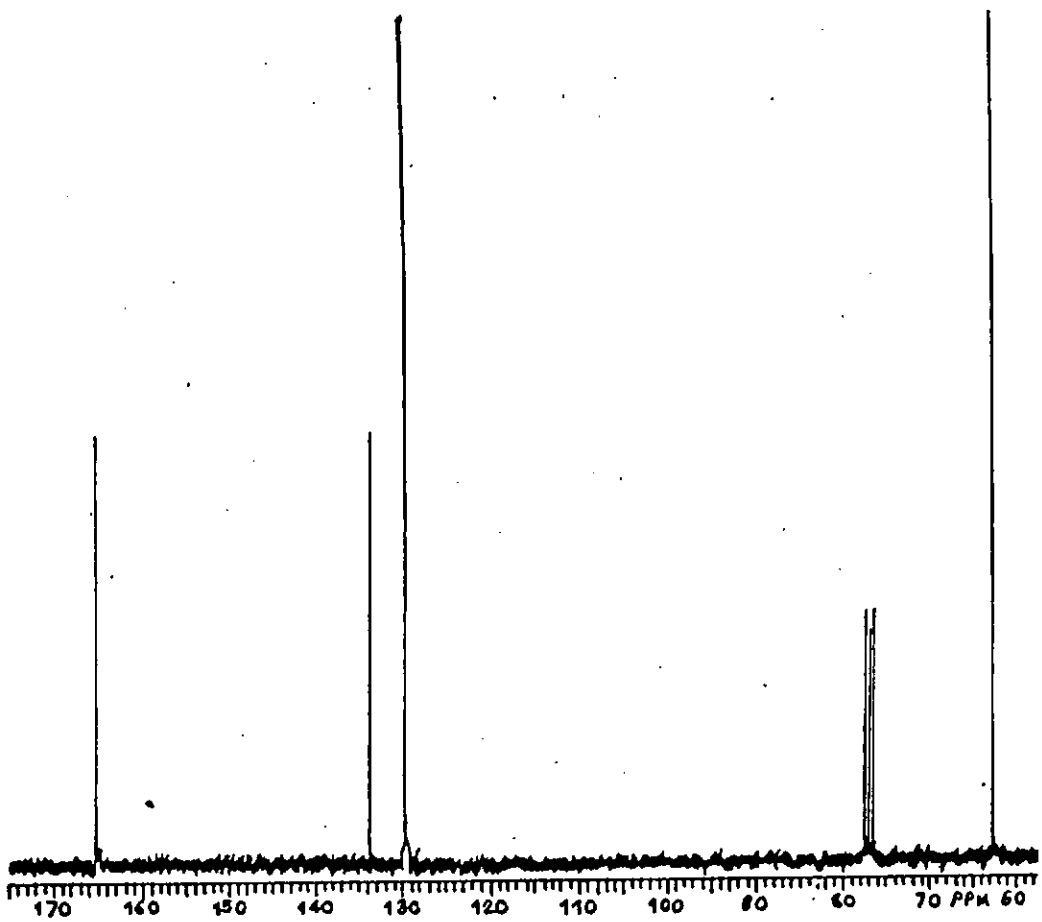


ภาพประกอบ 8 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร ข.



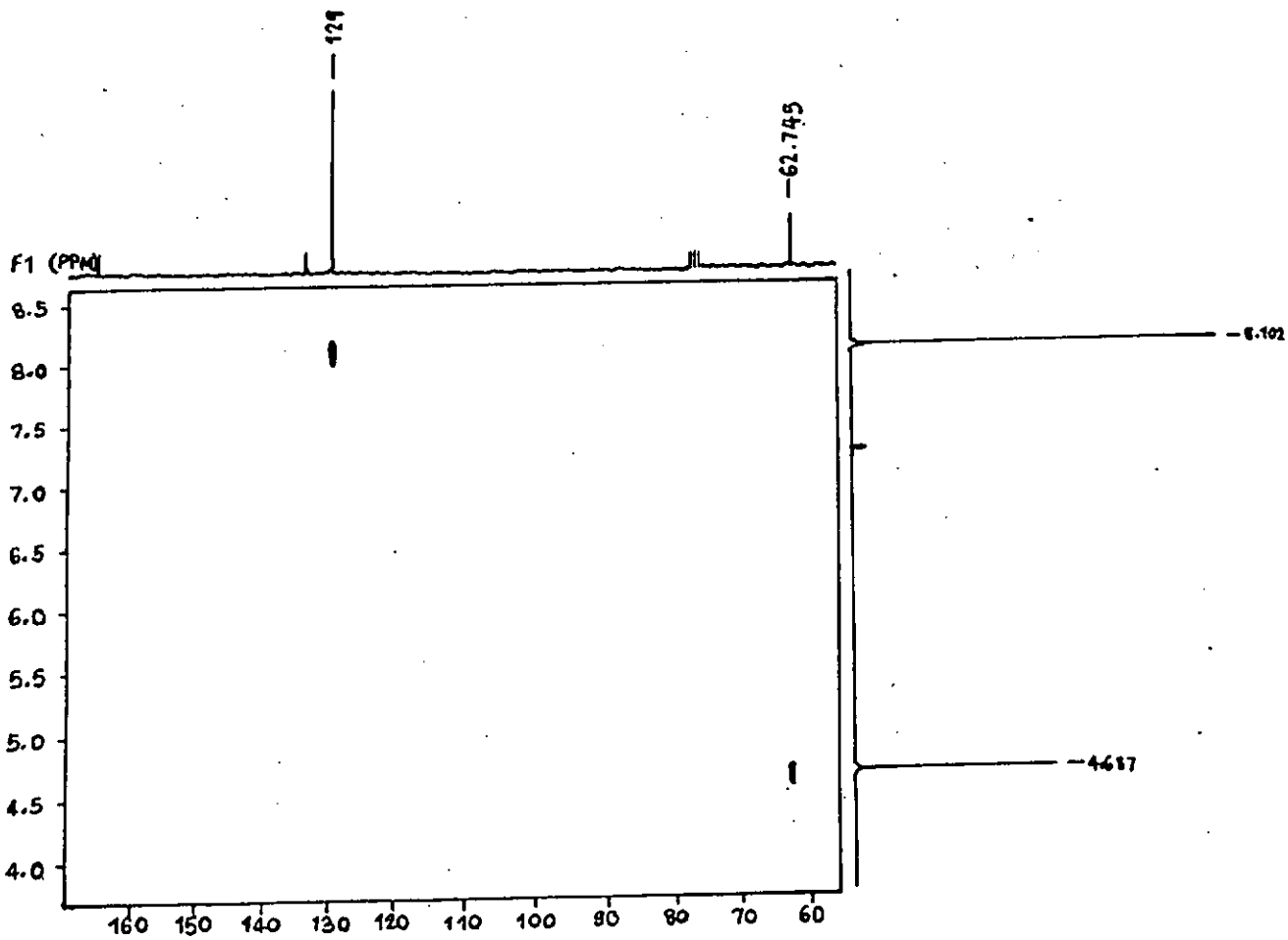
CHEMICAL SHIFT (ppm)

ภาพประกอบ 9 แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร ข.

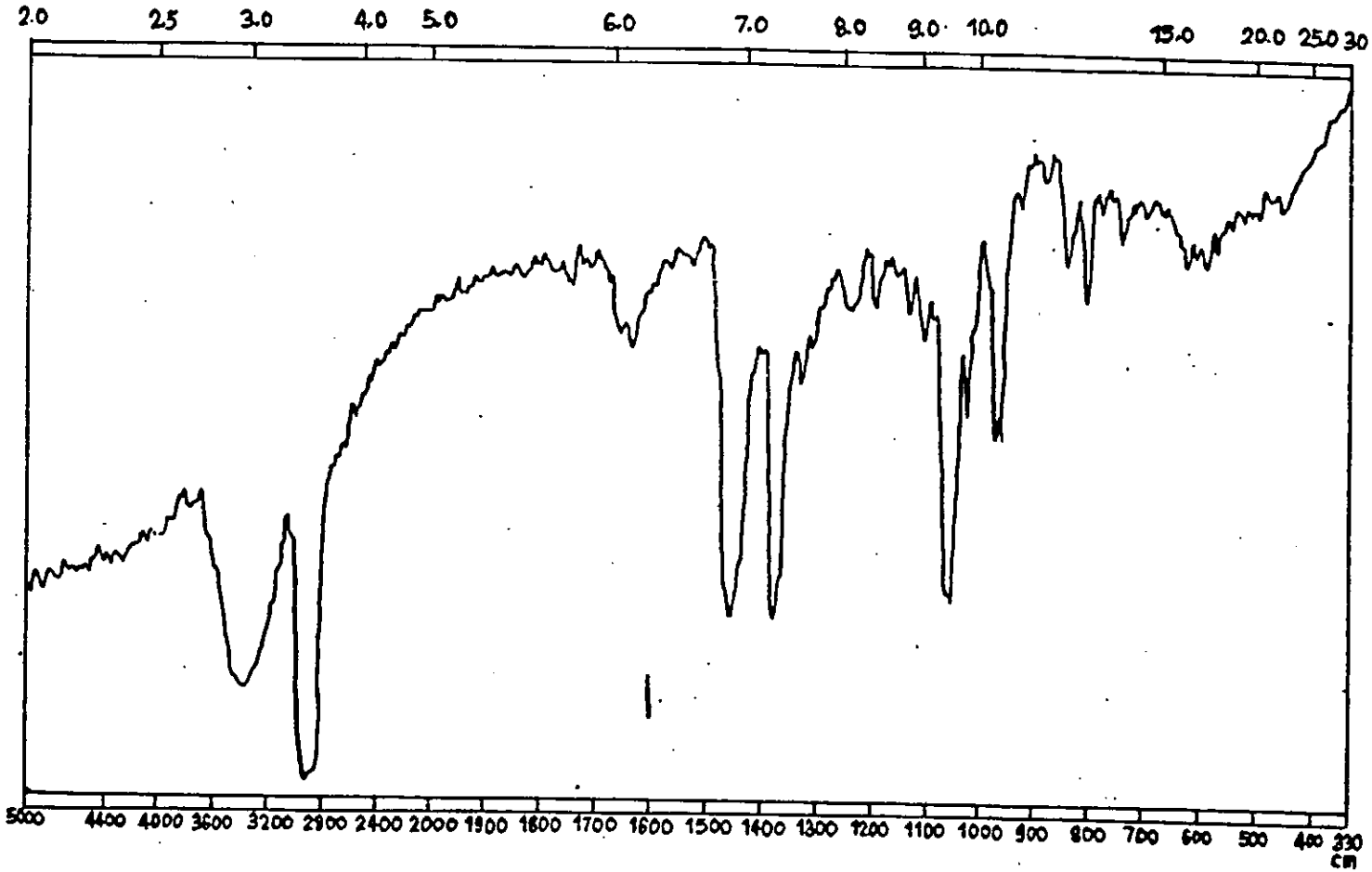


CHEMICAL SHIFT (ppm)

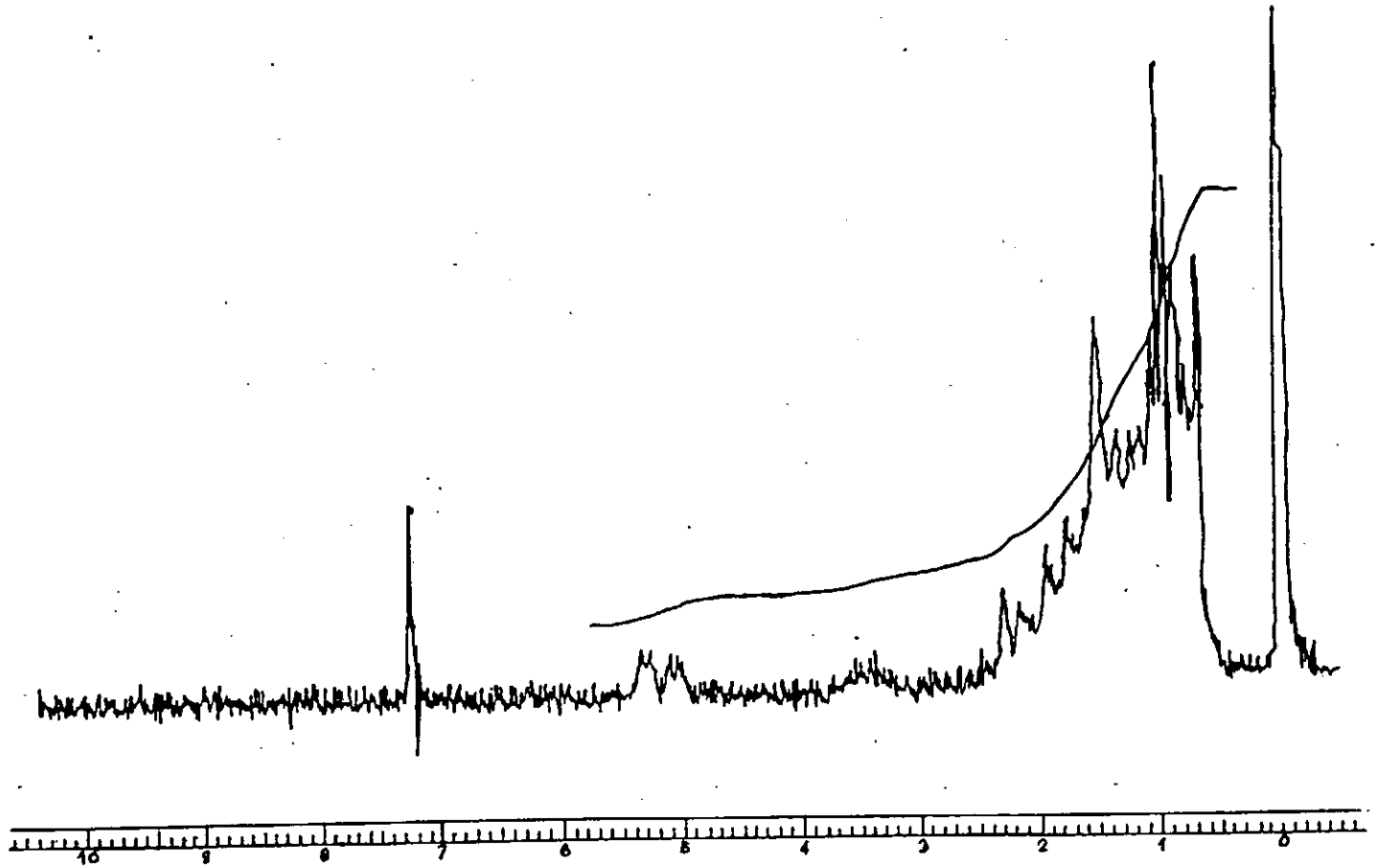
ภาพประกอบ 10 แสดงสเปกตรัมการวิเคราะห์ ^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร ข.



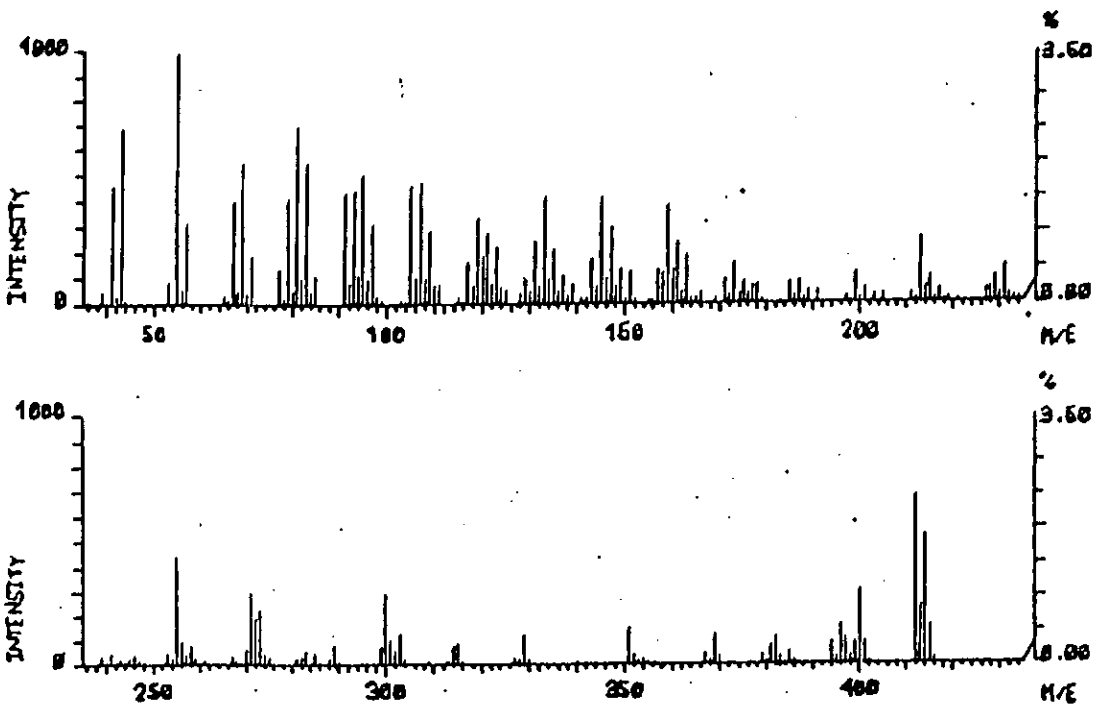
ภาพประกอบ 11 แสดงสเปกตรัมความสัมพันธ์ ^{1}H-^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร ข.



ภาพประกอบ 12 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร ค.



ภาพประกอบ 13 แสดงสเปกตรัมการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$) ของสาร ค.



ภาพประกอบ 14 แสดงแมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ค่า m/e ของสาร ค.

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวสำรวย ชื่อสกุล ขำทรัพย์

เกิดวันที่ 26 เดือนพฤษภาคม พุทธศักราช 2503

สถานที่เกิด เขต ภาษีเจริญ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 17 หมู่ 6 ต.บางแวก เขตภาษีเจริญ
กรุงเทพฯ 10160

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2521	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีวัดอัปสรสวรรค์
พ.ศ. 2526	กศ.บ.(เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
พ.ศ. 2533	กศ.ม.(เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจากหัวร้อยรู

บทคัดย่อ

ของ

สาธร ชาทรัพย์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี

กุมภาพันธ์ 2534

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากหัวร้อยรู โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบสารประกอบ 3 ชนิด คือ เบต้า-ไซโตสเตอรอล (จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส) เกลือคลอไรด์ของโซเดียมและโปแตสเซียม และสารประกอบคีโตน มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{16}O_2$ (สลายตัวที่ 170-268 องศาเซลเซียส)

A STUDY OF SOME CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *Hydnophytum formicarium* Jack.

AN ABSTRACT

BY

SUMRUAY KHUMSAP

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree in Chemistry

at Srinakarinvirot University

February 1991

Abstract

A study of chemical constituents from Hydnophytum formicarium Jack. by chromatography techniques and structural elucidation by spectroscopic methods, three major compounds were found. They are β-sitosterol (mp. 138-140 °c), chloride salts of sodium and potassium and ketone compound has a formular $C_{16}H_{16}O_2$ (mp. 170-268°c decomp.).