582.1
จ 663 ก
ร.3

# การศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีบางชนิดของหน้าเกล็ดปลา

ปริญญานิพนธ์

ของ

อารียา แย้มผกา

29 ส.ค. 2534

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กันยายน 2532

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

171620

# การศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีบางชนิดของหญ้าเกล็ดปลา

บทคัดย่อ

ของ

อาริยา แย้มผกา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กันยายน 2532

ในการนำสารสกัดเฮกเซนและเมทานอลของหญ้าเกล็ดปลามาทดสอบประเภทของสารอินทรีย์บางชนิด พบว่ามีอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสเตอรอยด์ เมื่อนำสารสกัดเฮกเซนมาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด มีจุดหลอมเหลว 140–141 องศาเซลเซียส วิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยอาศัยเทคนิคสเปคโตรสโกปี พบว่าเป็นเบตา-ไซโตสเตอรอล ส่วนในสารสกัดเมทานอล พบเบตา-ไซโตสเตอรอล และสารประกอบเกลือโซเดียม

# STUDY OF SOME MAJOR CHEMICAL CONSTITUNTS OF *Phyla nodiflora* greene

AN ABSTRACT

BY

AREEYA YAMPHAKA

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

September 1989

Screening test of hexane and methanol extracts of Phyla nodiflora Greene was investigated. Alkaloids, flavonoids and steroids were found in both extracts. Isolation of hexane extract by column chromatography, method, structure of such compound was shone to be β-sitosterol. Compounds isolated from methanol extract were β-sitosterol and sodium salt.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน

(ผศ.ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

..... กรรมการ

(ผศ.อาภรณ์ วิรสาร)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(ผศ.ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

..... กรรมการ

(ผศ.อาภรณ์ วิรสาร)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ดร.สายสนม ธรรมพิทักษ์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่ 26 เดือน กันยายน พ.ศ.2532

# ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้โดยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชุนชาติประเสริฐ ประธานกรรมการในการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล ประธานกรรมการในการสอบและกรรมการในการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์อาภรณ์ วีรสาร กรรมการ ดร.สายสนม ธรรมพิทักษ์ กรรมการ ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ลินา ผู้พัฒนพงศ์ หอพันธุ์ไม้ กรมป่าไม้ ที่ช่วยกรุณาตรวจสอบชนิดของหญ้าเกล็ดปลา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านของทางศูนย์ข้อมูลสมุนไพรที่กรุณาให้ความสะดวกและคำแนะนำต่าง ๆ เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการสาขาวิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องบดสมุนไพร และคำแนะนำต่าง ๆ จากเจ้าหน้าที่เป็นอย่างดียิ่ง

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณญาติมิตร และพี่ ๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

สารบัญ


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | บทนำ | 1 |
| | ภูมิหลัง | 1 |
| | ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| | ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| | ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| | คำนิยามศัพท์เฉพาะ | 3 |
| 2 | เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 6 |
| 3 | วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า | 17 |
| | การสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลา | 17 |
| | การทดสอบประเภทของสารอินทรีย์ในหญ้าเกล็ดปลา | 17 |
| | การทดสอบอัลคาลอยด์ | 17 |
| | การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ | 18 |
| | การทดสอบฟลาโวนอยด์ | 19 |
| | การทดสอบซาโปนิน | 20 |
| | การทดสอบคูมาริน | 21 |
| | การแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์ | 21 |
| | การแยกสารสกัดเฮกเซน | 21 |
| | การแยกสารสกัดเมทานอล | 22 |
| | การหาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ | 22 |
| 4 | ผลการศึกษาค้นคว้า | 23 |
| | ผลการสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลา | 23 |

| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4 | ผลการทดสอบประเภทของสารอันทรีย์ในหญ้าเกล็ดปลา | 23 |
| | ผลการทดสอบอัลคาลอยด์ | 23 |
| | ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ | 24 |
| | ผลการทดสอบฟลาโวนอยด์ | 24 |
| | ผลการทดสอบซาโปนิน | 25 |
| | ผลการทดสอบคูมาริน | 26 |
| | ผลการแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์ | 26 |
| | ผลการแยกสารสกัดเฮกเซน | 26 |
| | การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ | 28 |
| | ผลการแยกสารสกัดเมทานอล | 29 |
| | การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ | 31 |
| 5 | สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ | 32 |
| | ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า | 32 |
| | ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า | 32 |
| | วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า และรวบรวมข้อมูล | 32 |
| | สรุปผลการศึกษาค้นคว้า | 33 |
| | อภิปรายผล | 33 |
| | ข้อเสนอแนะ | 34 |
| บรรณานุกรม | | 35 |
| ภาคผนวก | | 39 |
| ประวัติผู้วิจัย | | 50 |

# บัญชีตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์ | 23 |
| 2 | ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ | 24 |
| 3 | ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์ | 25 |
| 4 | ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน | 25 |
| 5 | ผลการแยกสารสกัดเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี | 27 |
| 6 | ผลการแยกสารสกัดเมทานอลโดยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี | 30 |

# บัญชีภาพประกอบ


| ภาพประกอบ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | โครงสร้างของกรดเควอเรทาโรอิก (I) และกรดเสอร์ราทาจีนิก (II) | 7 |
| 2 | โครงสร้างของไอโซไฟมารา-9(11),15-ไดอีน-3-เบตา,19-ไดออล | 7 |
| 3 | โครงสร้างของอิโปลามิไอด์ | 8 |
| 4 | โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเปลือกของต้นคนทีเขมา | 8 |
| 5 | โครงสร้างของสารบางชนิดที่แยกได้จากใบของต้นอัคคีทวาร | 9 |
| 6 | โครงสร้างของเทวิไซด์ | 10 |
| 7 | โครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดที่แยกได้จากเปลือกของต้นผกากรอง | 11 |
| 8 | โครงสร้างของคัมพ์เฟอรอล | 11 |
| 9 | โครงสร้างของสารที่แยกได้จาก Lippia affinis sidoides | 12 |
| 10 | โครงสร้างของสารที่แยกได้จาก Lippia alnifolia และ Lippia grata | 12 |
| 11 | โครงสร้างของสารที่แยกได้จาก Lippia ukambensis Valke | 13 |
| 12 | โครงสร้างของสารบางชนิดที่แยกได้จากน้ำมันหอมระเหยของหญ้าเกล็ดปลา | 14 |
| 13 | โครงสร้างของ 6-ออกโซ-3,4,4เอ,5-เตตระไฮโดร-3-ไฮดรอกซี-2,2-ไดเมทิลแนพโท-1,2-ไพเรน | 15 |
| 14 | โครงสร้างของเทอร์คีสเตอโรน | 15 |
| 15 | แสดงพีคที่วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต | 42 |
| 16 | แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด | 43 |
| 17 | แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ $^1H$ NMR | 44 |
| 18 | แสดงแมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ค่า m/e | 47 |

ภาพประกอบ หน้า

19 แสดงสเปกตรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด
ของเบตา-ไซโตสเตอรอล ..... 48

20 แสดงสเปกตรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์ $^{1}H$ NMR ของเบตา-ไซโตสเตอรอล 49

# บทที่ 1

# บทนำ

## ภูมิหลัง

มนุษย์รู้จักวิธีนำสมุนไพรที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้เป็นยารักษาโรค โดยนำมาต้มชงดื่ม หรือนำไปแปรรูป เช่น การเคี่ยวให้งวดแล้วปั้นเป็นก้อน บดให้ละเอียดบรรจุในแคปซูล เพื่อสะดวกในการใช้และเก็บรักษา ปัจจุบันงานวิจัยทางสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง และพบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการรักษาหรือยับยั้งโรคได้เป็นอย่างดี เช่น หญ้าหนวดแมว หรือพยับเมฆ (Orthosiphon grandiflorous Boldingh) มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ และทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง เนื่องจากมีสารประเภทเกลือโปแทสเซียมและออร์โทสิโฟนิน (orthosiphonin) อยู่เป็นจำนวนมาก จึงนำมาใช้เป็นยารักษาโรคนิ่ว (Grevenstuk and Myreyen. 1941 : 1610) ในสมุนไพรมีสารองค์ประกอบหลายชนิด เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloids) ไกลโคไซด์ (glycosides) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซาโปนิน (saponins) และคูมาริน (coumarins) เป็นต้น (นันทวัน บุณยะประภัศร. ม.ป.ป. : 5) สารเหล่านี้อาจนำไปใช้เป็นยาโดยตรง หรืออาจนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมผลิตภัณฑ์ทางยาต่อไป ฉะนั้นถ้ามีการศึกษาผลิตภัณฑ์ทางยาที่เตรียมได้จากสมุนไพรกันอย่างจริงจัง จะสามารถลดการขาดดุลย์การค้าที่ต้องสั่งซื้อวัตถุดิบจากต่างประเทศเพื่อใช้ผลิตยา ตลอดจนเป็นการสร้างงาน และชักนำให้ประชาชนปลูกพืชสมุนไพรมากขึ้น

หญ้าเกล็ดปลาเป็นสมุนไพรที่ใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นในการรักษาโรคเบาหวานตามตำรับยา พระวัย จตุตาลโย วัดเทพพนมยงค์ จังหวัดสระบุรี (นพรัตน์ พัฒนเงิน. 2527 : 44) จากการศึกษาน้ำยาสกัดตามตำรับยานี้ พบว่าน้ำยาสกัดจากสมุนไพรโดยต้มกับน้ำในปริมาณ 20 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม สามารถลดน้ำตาลในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยสารแอลลอกซาน (alloxan) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2-6 (สมบัติ พุ่มสาขา.

2530 : 39) เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในหญ้าเกล็ดปลา จึงน่าทำการวิจัยทางเคมีของพืชดังกล่าว เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและเตรียมผลิตภัณฑ์ทางยาต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลาโดยใช้เฮกเซน และเมทานอล เป็นตัวทำละลายตามลำดับ

2. เพื่อทดสอบประเภทของสารอินทรีย์บางชนิด

3. เพื่อทำการแยกสารที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์หาโครงสร้าง

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถสกัดและแยกสารบางชนิดจากหญ้าเกล็ดปลา

2. สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประกอบกับข้อมูลทางสาขาอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น เภสัชวิทยาและพิษวิทยา เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยต่อไป

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ใช้เฮกเซน และเมทานอล เป็นตัวทำละลายตามลำดับ ในการสกัดสารบางชนิดจากหญ้าเกล็ดปลา

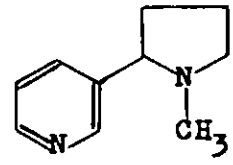
2. ทดสอบอัลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน จากสารสกัดเฮกเซน และเมทานอล

3. แยกสารบางชนิดที่ได้จากการสกัดโดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography)

4. ศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy)

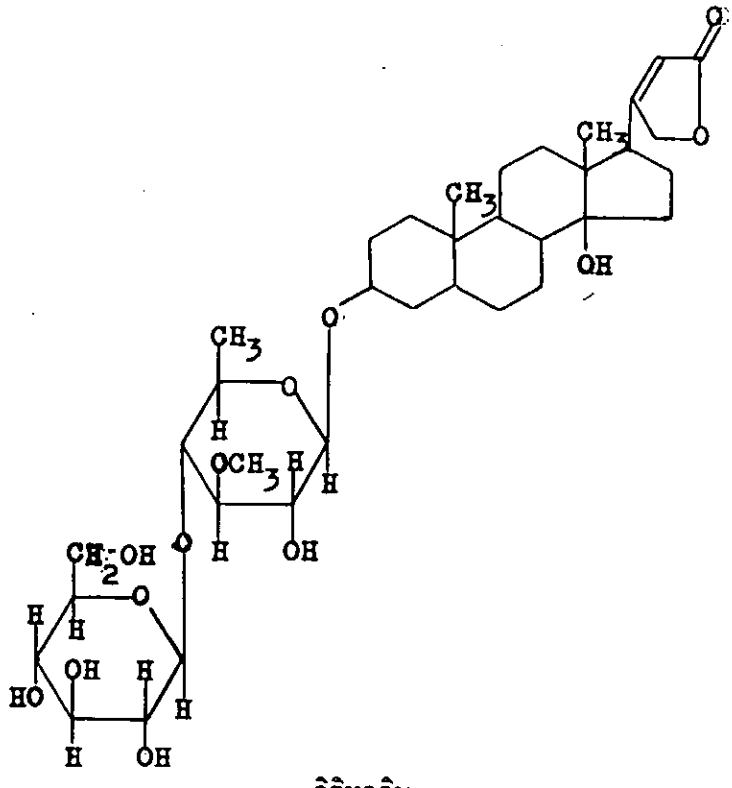
คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1. อัลคาลอยด์ เป็นสารที่มีรสขม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีสมบัติเป็นเบส เมื่ออยู่ในรูปของเกลือจะละลายน้ำได้ ถ้าอยู่ในรูปของเบสจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น นิโคติน (nicotine)



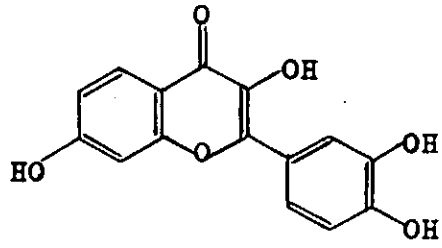
นิโคติน

2. ไกลโคไซด์ เป็นสารประกอบซึ่งมี 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเป็นสารซึ่งมีโครงสร้างและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแตกต่างกัน เช่น ดิจิทาลิน (digitalin)



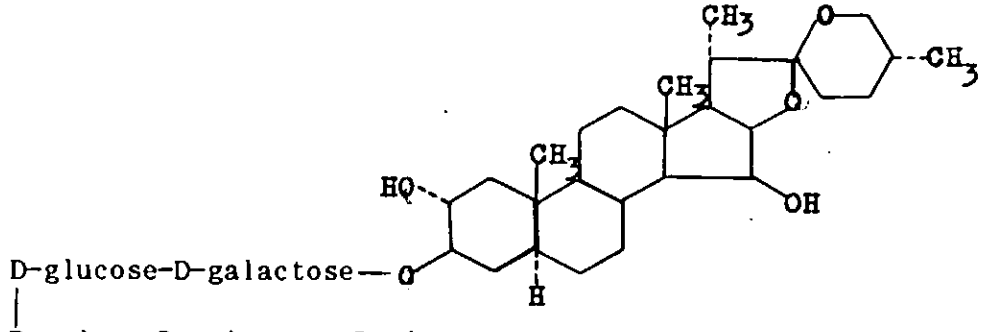
ดิจิทาลิน

3. ฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่พบในส่วนของพืชที่มีสี เช่น ดอก ผล ใบ และอาจพบบ้างในส่วนที่เป็นเปลือก ราก หรือแก่น ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น $C_6-C_3-C_6$ เช่น ไฟซีทิน (fisetin)



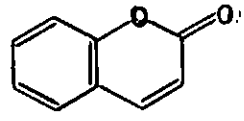
ไฟซีทิน

4. ซาโปนิน เป็นสารประเภทไกลโคไซด์ ซึ่งส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเป็นสเตอรอยด์ (steroids) หรือไตรเทอร์พีน (triterpenes) เช่น ดิจิโทนิน (digitonin)

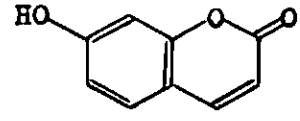



ดิจิโทนิน

5. คูมาริน เป็นอนุพันธ์ของ 1,2-เบนโซไพโรน (1,2-benzopyrone) ส่วนใหญ่มักอยู่ในสภาพอิสระ พบบ้างในสภาพไกลโคไซด์ เช่น อัมเบลลิเฟอโรน (umbelliferone)

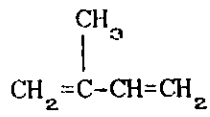


1,2-เบนโซไพโรน

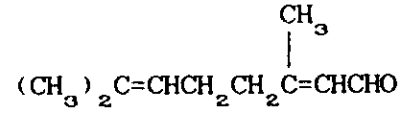


อัมเบลลิเฟอโรน

6. เทอร์พีน (terpenes) เป็นสารประกอบที่ได้จากการรวมตัวของไอโซพรีน (isoprene) ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไป เช่น เจอรานิอัล (geranial)



ไอโซพรีน



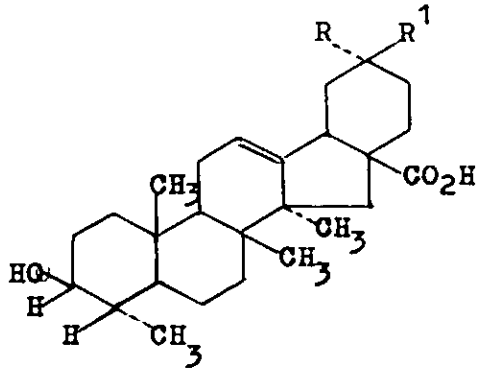
เจอรานิอัล

# บทที่ 2

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าเกล็ดปลาเป็นพืชสมุนไพรที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Phyla nodiflora Greene หรือ Lippia nodiflora Greene (เต็ม สมิตินันท์. 2523 : 208) จัดอยู่ในวงศ์ไม้สัก (Verbenaceae) มีชื่ออื่นว่า หญ้าพันกระต่าย ไต่หยี่หนึ่งจี้ ก้วยกังตั้ง (อุไรวรรณ ประยูรรัตน์ และคนอื่น ๆ. 2524 : 5-193 และเสนาะ บุญมี. 2529 : 216) หญ้าเกล็ดปลาเป็นไม้ที่ขึ้นเลื้อยคลุมดิน ข้อที่แตะดินจะงอกออกมายึดเกาะดินไว้ ลำต้นมีขนสั้น ๆ ตัวใบยาว 1-2.5 เซนติเมตร เนื้อใบค่อนข้างหนา ปลายใบมน ดอกออกเป็นช่อจากง่ามใบ มีดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีม่วงแดงอ่อน หญ้าเกล็ดปลามีฤทธิ์ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะเป็นเลือด ไอเป็นเลือด แผลฟกช้ำ แก้ไข้ และแผลมีหนอง (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคนอื่น ๆ. 2523 : 213) ได้มีผู้ศึกษาพืชสมุนไพรในวงศ์ไม้สัก ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

รานกาสวามิ ศรีนิวาสา และ สรานกาน (Rangaswami, Srinivasa and Sarangan. 1969 : 377) ได้ทำการสกัดเปลือกของต้นอัคคีทวาร (Clerodendron serratum Moon) พบสารประเภทซาโปจินิน และสารประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ กรดโอลีโนลิก (oleanolic acid) กรดเควอเรทาโรอิก (queretaroic acid) (I) และกรดเซอร์ราทาจีนิก (serratagenic acid) (II) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 1

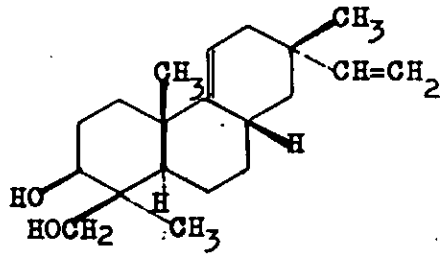



(I; R = $CH_3$, $R^1$ = $CH_2OH$)

(II; R = $CO_2H$, $R^1$ = $CH_3$)

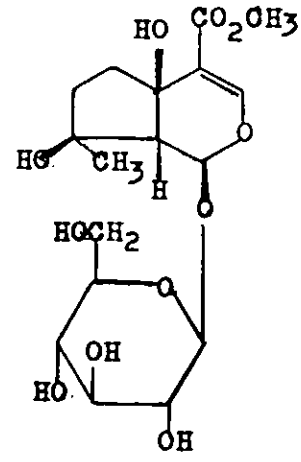
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของกรดเควอเรทาโรอิก (I) และกรดเซอร์ราทาจินิก (II)

เจฟเฟอริส์ และ ราทาจช์ซาก (Jefferies and Ratajczak. 1973 : 514) ได้ทดลองแยกสารจากต้น Newcastlia viscida พบไอโซไพมารา-9(11),15-ไดอีน-3-เบตา,19-ไดออล (isopimara-9(11),15-diene-3-β,19-diol) ซึ่งเป็นสารประเภทไดเทอร์พีนอยด์ มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 2



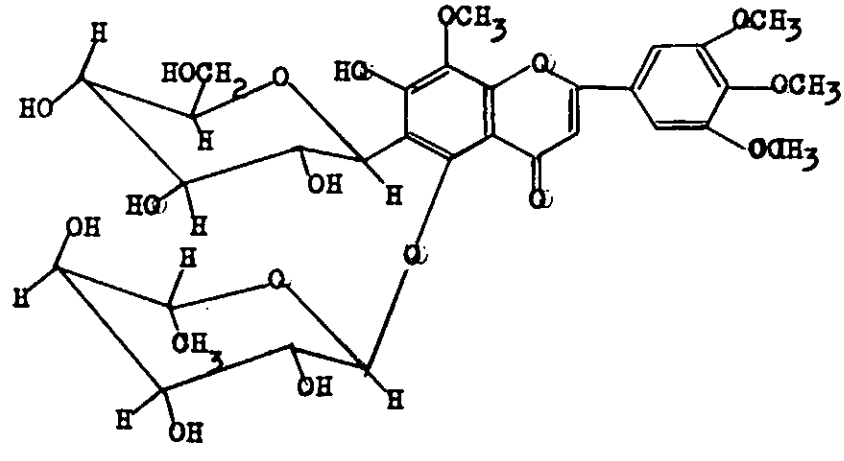

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของไอโซไพมารา-9(11),15-ไดอีน-3-เบตา,19-ไดออล

การ์เนียร์ (Garnier. 1978 : 223) ได้ทำการสกัดแยกสารจากต้น Stachytarpheta guyanensis และ Stachytarpheta mutabilis พบสารอิโปลามิไอด์ (ipolamiide) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 3



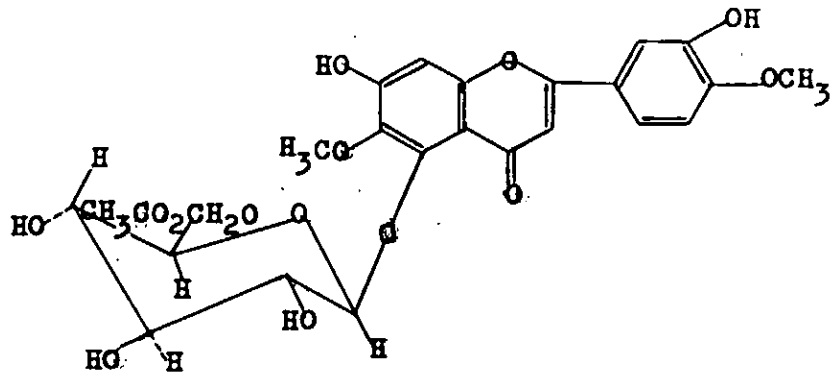
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของอิโปลามิไอด์

สุบราเนียน และ มิสรา (Subranian and Misra. 1979 : 540 - 542) ได้ทำการสกัดเปลือกของต้นคนทีเขมา (Vitex negundo) และพบสารประเภทฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ 2 ชนิด คือ 6-ซี-กลูโคซิล-5-ไอ-แรมโนไพราโนซิลไตรเมทอกซีโวโกนิน (6-C-glucosyl-5-O-rhamnopyranosyl trimethoxy wogonin) และ อะซีโรซิน-5-ไอ-กลูโคไซด์โมโนแอซีเตด (acerosin-5-O-glucoside monoacetate) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 4



6-ซี-กลูโคซิล-5-ไอ-แรมโนไพราโนซิลไตรเมทอกซีโวโกนิน

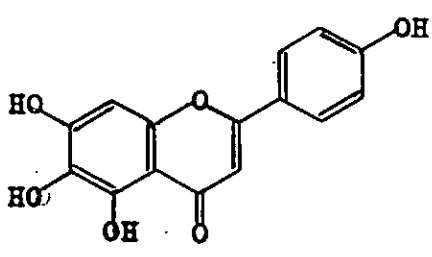
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเปลือกของต้นคนทีเขมา



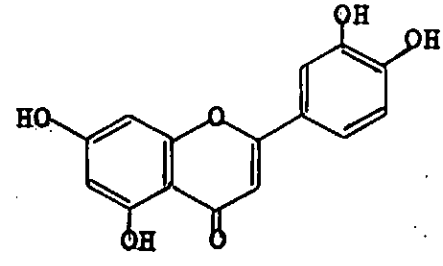
อะซีโรซิน-5-โอ-กลูโคไซด์โมโนแอซีเตต

ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเปลือกของต้นคนทีเขมา

แนร์ และคนอื่น ๆ (Nair and others. 1979 : 319) ได้สกัดสารจากใบของต้นอัคคีทวาร พบแอลฟา-สปินาสเตอรอล ($\alpha$-spinasterol) อะพิจีนิน (apigenin) ลูทีโอลิน (luteolin) ไบคาเลอิน (baicalein) สคูเทลลาเรอิน (scutellarein) 6-ไฮดรอกซีลูทีโอลิน (6-hydroxyluteolin) คาเฟอิก (caffeic) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) กลูโคส (glucose) อะราบิโนส (arabinose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) รวมทั้งฟลาโวน (flavone) และกรดฟีโนลิก (phenolic acid) โดยเฉพาะพืชในสกุล Clerodendron วงศ์ไม้สัก จะพบสารประเภทฟลาโวนอยด์เป็นส่วนใหญ่ สารบางชนิดที่แยกได้จากใบของต้นอัคคีทวารมีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 5

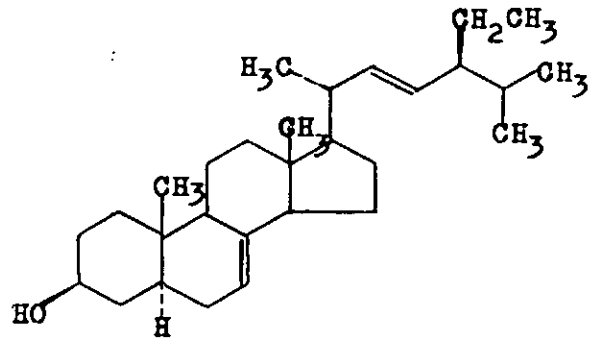


สคูเทลลาเรอิน



ลูทีโอลิน

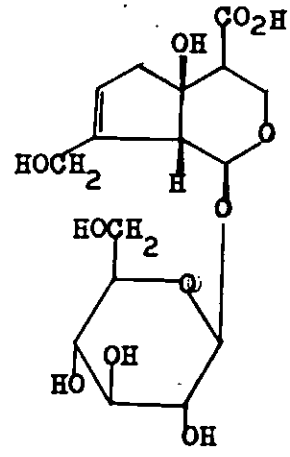
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารบางชนิดที่แยกได้จากใบของต้นอัคคีทวาร



แอลฟา-สปินาสเตอรอล

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารบางชนิดที่แยกได้จากใบของต้นอัคคีทวาร

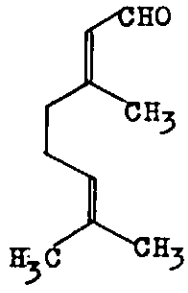
ฟอร์ด และ เบนดัลล์ (Ford and Bendall. 1980 : 499) ได้สกัดสารจากใบและลำต้นของผกากรอง (Lantana camara) พบเทวีไซด์ (theveside) และสารพวกเกลือโซเดียม เทวีไซด์นี้เคยค้นพบมาแล้วจากพืช 2 ชนิด ในวงศ์ Apocynaceae มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 6



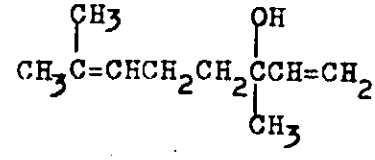
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของเทวีไซด์

อวาดฮูท ดิชิท และ วาร์มา (Avadhoot, Dixit and Varma. 1980 : 399) ได้สกัดสารจากเปลือกของผกากรอง พบพวกน้ำมัน กรดไขมัน และสเตอรอยด์ 4 ชนิด

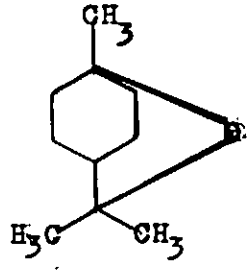
ชนิดหนึ่งเป็น เบตา-ไซโตสเตอรอล (β-sitosterol) และพบน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด 4 ชนิด คือ ซิทรัล (citral) ลินาโลออล (linalool) 1,8-ซีนีโอล (1,8-cineole) และ เทอร์พีนีออล (terpineol) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 7



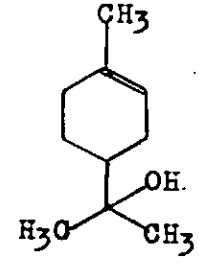
ซิทรัล



ลินาโลออล



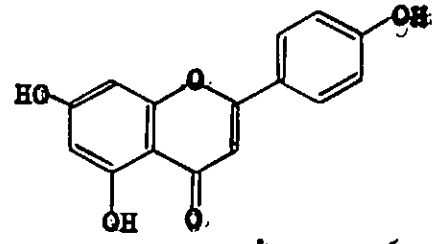
1,8-ซีนีโอล



เทอร์พีนีออล

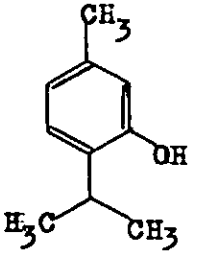
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดที่แยกได้จากเปลือกของต้นผกากรอง

ทิวารี มาสูด และ มิโนชา (Tiwari, Masood and Minocha. 1980 : 309) ได้สกัดสารจากดอกของ Gmelina phillipinensis พบคีมพ์เฟอรอล (kaempferol) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 8

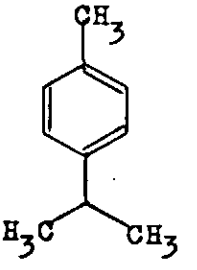


ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของคีมพ์เฟอรอล

คราเวียโว และคนอื่น ๆ (Craveiro and others. 1981 : 598 - 600) ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุล Lippia 6 ชนิด ได้แก่ Lippia alba, Lippia alnifolia, Lippia affinis aristata, Lippia aristata, Lippia grata และ Lippia affinis sidoides พบสารหลายประเภท ได้แก่ โมโนเทอร์พีน (monoterpenes) เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes) สารประกอบอะโรเมติก (aromatic compounds) แอลกอฮอล์ (alcohols) และคีโตน (ketones) สารที่พบในน้ำมันหอมระเหยของ Lippia affinis sidoides มี ไทมอล (thymol) และแอลฟา-ฟิลแลนดรีน ($\alpha$-phellandrene) เป็นส่วนใหญ่ มีโครงสร้างดังแสดงใน ภาพประกอบ 9



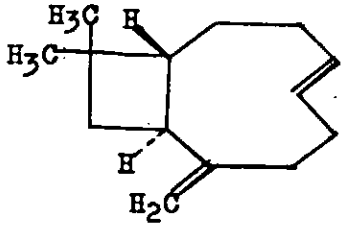
ไทมอล



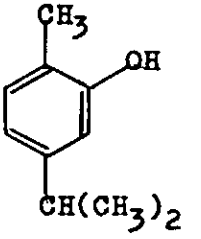
แอลฟา - ฟิลแลนดรีน

ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของสารที่แยกได้จาก Lippia affinis sidoides

ส่วนในน้ำมันหอมระเหยของ Lippia alnifolia และ Lippia grata มี คาริโอไฟลลีน (caryophyllene) และคาร์วาครอล (carvacrol) ตามลำดับ มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 10



คาริโอไฟลลีน

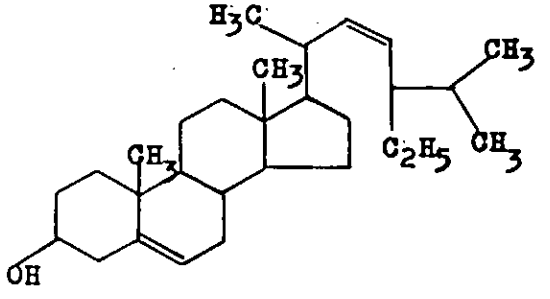


คาร์วาครอล

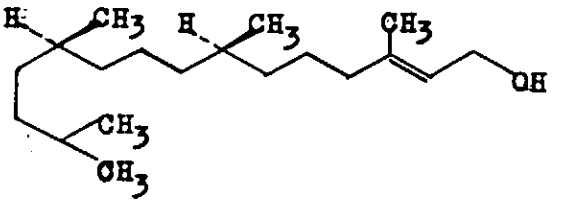
ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของสารที่แยกได้จาก Lipia alnifolia และ Lippia grata

ในน้ำมันหอมระเหยของ Lippia affinis aristata มี แกมมา-คาร์ดินีน (ɣ-cardinene) ใน Lippia aristata มีซาบีนีน (sabinene) ใน Lippia alba มี เจอร์นิอัล (gernial)

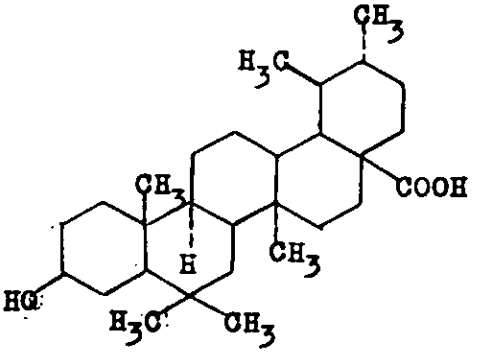
โชโก และ แครงค์ (Chogo and Crank. 1982 : 186 - 188) ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้น Lippia ukambensis Valke พบการบูร (camphor) 36.5% 4-ทูจานอล (4-thujanol) 18.5% และสารประเภทเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ชนิดอื่น ส่วนสารสกัดจากใบมีกรดไขมัน สติกมาสเตอรอล (stigmasterol) ไฟทอล (phytol) กรดเออร์โซลิก (ursolic acid) และแคมฟีนไกลคอล (camphene glycol) ซึ่งส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในการทำน้ำหอม มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 11



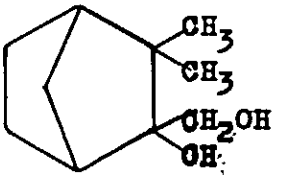
สติกมาสเตอรอล



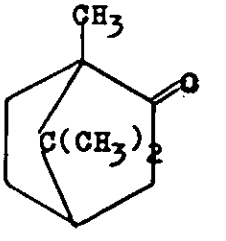
ไฟทอล



กรดเออร์โซลิก



แคมฟีนไกลคอล

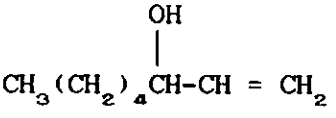


การบูร

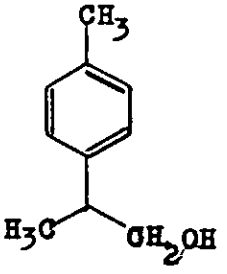
ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของสารที่แยกได้จาก Lippia ukambensis Valke

เบียนโก และคนอื่น ๆ (Bianco and others. 1984 : 901) ได้ตรวจพบไกลโคไซด์ 2 ชนิด ในต้น Verbena officinalis Linn คือ เวอร์บาสโคไซด์ (verbascoside) และยูโคโวไซด์ (eukovoside)

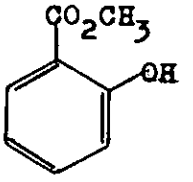
อีลาโควิช และ สตีเวน (Elakovich and Stevens. 1985 : 504 - 505) ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากหญ้าเกล็ดปลา (Lippia nodiflora Greene) พบสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งส่วนใหญ่เป็น เซสควิเทอร์พีนคาลาเมนีน (sesquiterpene calamenene) 19.9% และ เบตา-คาริโอไฟลลีน (β-caryophyllene) 18.7% พบสารที่มีออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล ได้แก่ 1-ออกทีน-3-ออล (1-octen-3-ol) ฟีนีทิลแอลกอฮอล์ (phenethyl alcohols) ลินาโลออล พารา-ไซเมน-8-ออล (p-cymen-8-ol) และ เมทิลซาลิซีเลต (methylsalicylate) อยู่ 10-20% มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 12



1-ออกทีน-3-ออล



พารา-ไซเมน-8-ออล

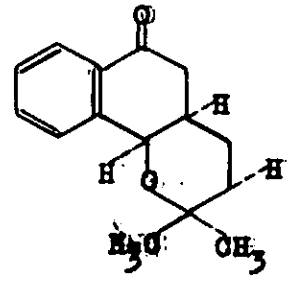


เมทิลซาลิซีเลต

ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของสารบางชนิดที่แยกได้จากน้ำมันหอมระเหยของหญ้าเกล็ดปลา

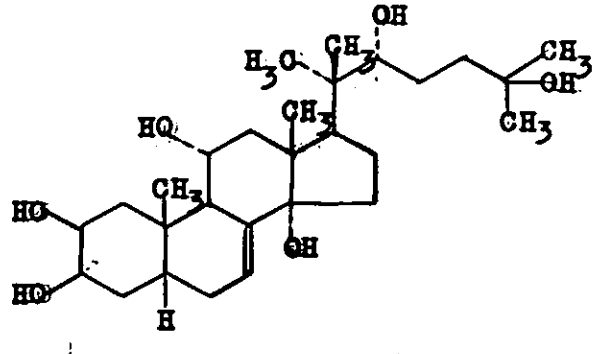
มาแคมบิรา และคนอื่น ๆ (Macambira and others. 1986 : 310 - 312) ได้สกัดสารจากต้น Lippia sidoides Cham พบสารใหม่เป็นพวกแนฟโทควินอยด์ (naphthoquinoids) คือ 6-ออกโซ-3,4,4เอ,5-เตตระไฮโดร-3-ไฮดรอกซี-2,2-

ไดเมทิลแนพโท-1,2-ไพเรน (6-oxo-3,4,4a,5-tetrahydro-3-hydroxy-2,2-dimethylnaphtho-1,2-pirane) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของ 6-ออกโซ-3,4,4เอ,5-เตตระไฮโดร-3-ไฮดรอกซี-2,2-ไดเมทิลแนพโท-1,2-ไพเรน

จากการสกัดเปลือกของ Vitex grabata พบเอกไดสเตอรอยด์ (ecdysteroids) 2 ชนิด คือ 20-ไฮดรอกซีเอกไดโซน (20-hydroxyecdysone) และ 11-แอลฟา,20-ไฮดรอกซีเอกไดโซน (11-$\alpha$,20-hydroxyecdysone) ซึ่งเป็นสารใหม่ที่พบในพืชชนิดนี้ และนิยมเรียกว่า เทอร์คีสเตอโรน (turkesterone) ใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (antitumor) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 14 (Werawattanametin, Podimuang and Suksamrarn. 1986 : 365)



ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของเทอร์คีสเตอโรน

สุภาลักษณ์ และ โยชิดา (สุภาลักษณ์ และ Yoshida. 2531 : 31 - 35) ทำการวิเคราะห์ธาตุในหญ้าเกล็ดปลา โดยใช้อินดักทีฟลีคับเปิลพลาสมาอะตอมมิกอิมิสสันสเปกโทรมีทรี (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry) พบว่าในหญ้าเกล็ดปลามี ธาตุโบรอน แมกนีเซียม แคลเซียม ติตาเนียม เหล็ก โซเดียม ทองแดง โมลิบดินัม ตีบุก ฮาฟเนียม รูบิเดียม โรเดียม โครเมียม นิเกิล สังกะสี และ ซิลิกอน

# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

1. การสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลา

นำหญ้าเกล็ดปลาทั้งต้น ราก ใบ ดอก และผล ที่ตากแห้งบดละเอียดมาสกัดด้วยเฮกเซน โดยวิธีแช่ในตัวทำละลาย เป็นเวลาอย่างน้อย 3 สัปดาห์ จึงเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่อีกครั้ง กรองสารละลายที่สกัดได้แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดเฮกเซน หลังจากสกัดด้วยเฮกเซนแล้วนำกากที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอลโดยวิธีเดียวกันจะได้สารสกัดเมทานอล นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบประเภทของสารอินทรีย์และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

2. การทดสอบประเภทของสารอินทรีย์ในหญ้าเกล็ดปลา (ชมรมพฤกษเคมี. 2521, 2523 : 206 )

การเตรียมรีเอเจนต์สำหรับทดสอบอัลคาลอยด์ และคาร์ดินอกไกลโคไซด์อยู่ในภาคผนวก

2.1 การทดสอบอัลคาลอยด์

ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์ ใช้ปฏิกิริยาของอัลคาลอยด์กับรีเอเจนต์ (reagent) บางชนิดที่จะให้ตะกอนที่เห็นชัดเจน รีเอเจนต์ที่ใช้คือ เมเยอร์ (Mayer's reagent) วอลเซอร์ (valser's reagent) และมาร์ม (Marme's reagent) รีเอเจนต์ทั้ง 3 นี้ จะให้ตะกอนสีขาวกับอัลคาลอยด์ ดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จะให้ตะกอนสีส้ม ส่วนเคร้าท์ (Kraut's reagent) กับแวกเนอร์ (Wagner's reagent) จะให้ตะกอนสีน้ำตาลกับอัลคาลอยด์ ในที่นี้จะทดสอบกับรีเอเจนต์ 3 ชนิด คือ ดราเจนดอร์ฟ แวกเนอร์ และมาร์มรีเอเจนต์

ขั้นตอนการทดสอบ

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1 มา 1 กรัม เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนและอุ่นในเครื่องอังไอน้ำ 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมซีไรท์ (celite) แล้วกรอง แบ่งสารละลายที่กรองได้ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด นำแต่ละหลอดมาทดสอบโดยใช้ดราเจนดอร์ฟ แวกเนอร์ และมาร์มรีเอเจนต์ เทียบสี และตะกอนกับหลอดเปรียบเทียบ

2.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ในการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ให้ได้ผลนั้น ควรใช้รีเอเจนต์ที่สามารถทดสอบองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ ส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ วงแลคโทน และน้ำตาล

ขั้นตอนการทดสอบ

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1 มา 1 กรัม เติมสารละลายเลดแอซิเตด เข้มข้น ร้อยละ 10 จำนวน 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในเครื่องอังไอน้ำให้เดือด 15 นาที พร้อมทั้งคนตลอดเวลา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและกรอง นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ขณะที่สกัดควรเขย่าเบา ๆ เพื่อป้องกันการเกิดอิมัลชัน (emulsion) รวมชั้นของคลอโรฟอร์มที่สกัดได้เติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยคลอโรฟอร์มออกให้เหลือหนึ่งในสิบของปริมาตรเดิม แบ่งสารละลายออกเป็น 3 ส่วน นำมาทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ วงแลคโทน และน้ำตาล ดังนี้

ก. ส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด (Libermann-Burchard reaction) โดยเติมแอซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) 3 หยด ลงในหลอดทดสอบหลอดที่ 1 แล้วค่อย ๆ หยดสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดที่ 1 ถ้ามีสเตอรอยด์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

ข. ส่วนที่เป็นวงแลคโทน (lactone ring) ทดสอบด้วยเคดด์รีเอเจนต์ (Kedd's reagent) และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน

2-3 หยด ลงในหลอดทดสอบหลอดที่ 2 ถ้ามีส่วนที่เป็นวงแลคโทนสารละลายให้สีน้ำเงินหรือม่วง

ค. ส่วนที่เป็นน้ำตาล ทดสอบด้วยปฏิกิริยาเคลเลอร์-คิไลนี (Keller-Killiani reaction) โดยเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น ร้อยละ 10 จำนวน 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในหลอดทดสอบหลอดที่ 3 แล้วเอียงทำมุม 45 องศา เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จำนวน 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ให้ไหลลงตามข้างหลอด จะมีการแยกชั้นเกิดขึ้น ถ้ามีสีน้ำตาลเกิดขึ้นตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลายแสดงว่ามีน้ำตาลอยู่ แต่ถ้ามีสีเขียวอ่อนอยู่ชั้นบนแสดงว่ามีสเตอรอยด์อยู่

2.3 <u>การทดสอบฟลาโวนอยด์</u>

ในการทดสอบฟลาโวนอยด์ใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน (cyanidin) กับลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanin) แต่การตรวจสอบว่าเป็นอะไกลโคน หรือไกลโคไซด์นั้น สังเกตสีในชั้นออกทานอล โดยไกลโคไซด์จะไม่ให้สีในชั้นออกทานอล ส่วนอะไกลโคนจะให้สีในชั้นออกทานอลและชั้นน้ำไม่มีสี การสังเกตสีถ้าในชั้นออกทานอลให้สีส้มถึงสีแดง แสดงว่าเป็นฟลาโวน ถ้าให้สีแดงถึงสีแดงเลือดหมู แสดงว่าเป็นฟลาโวนอล (flavonols) และถ้าให้สีแดงเลือดหมูถึงสีม่วง แสดงว่าเป็นฟลาวาโนน (flavanones)

<u>ขั้นตอนการทดสอบ</u>

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1 มา 1 กรัม สกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร แยกเอาชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ออก เติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร กรอง แบ่งสารละลายที่ได้เป็น 3 ส่วน นำไปทดสอบการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน และ ลิวโคแอนโทไซยานินเทียบกับหลอดที่ 1 ซึ่งเป็นหลอดเปรียบเทียบ

<u>การทดสอบไซยานิดิน</u>

นำสารละลายในหลอดทดสอบหลอดที่ 2 เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร และใส่ชิ้นแมกนีเซียม 3-4 ชิ้น สังเกตสีที่สายฟองแมกนีเซียม

เติมน้ำกลั่น 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมออกทานอล 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้แยกชั้น สังเกตสีในแต่ละชั้น

<u>การทดสอบลิวโคแอนโทไซยานิน</u>

นำสารละลายในหลอดทดสอบหลอดที่ 3 เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่น 5 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

2.4 <u>การทดสอบซาโปนิน</u>

ถ้านำซาโปนินมาไฮโดรไลส์ (hydrolyse) จะได้ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล เรียกว่า ซาโปจินิน (sapogenin) กับส่วนที่เป็นน้ำตาล ซาโปจินินเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำมี 2 ประเภท คือ สเตอรอยดอลซาโปจินิน (steroidal sapogenin) และไตรเทอร์พีนอยดอลซาโปจินิน (triterpenoidal sapogenin) การทดสอบซาโปจินิน มีได้หลายวิธี ในที่นี้จะใช้การทดสอบฟอง และการทดสอบสีโดยวิธีของลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ดในการทดสอบฟอง หลังเขย่าจะให้ฟองรูปรวงผึ้งสูง 2 เซนติเมตร คงตัวอยู่นาน 30 นาที แต่หลังจากเติมกรดแล้วเขย่าฟองจะหายไปเกิดตะกอนขึ้นแทน ส่วนการทดสอบสีโดยวิธีลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ดนั้น ถ้าเป็นสเตอรอยดอลซาโปจินิน จะให้สีน้ำเงินหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้าเป็นไตรเทอร์พีนอยดอล ซาโปจินิน จะให้สีแดงชมพู หรือม่วง

<u>ขั้นตอนการทดสอบฟอง</u>

นำหญ้าเกล็ดปลาแห้งบดละเอียด 100 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มบนเครื่องอังไอน้ำ 5 นาที กรองขณะร้อน ทิ้งให้สารละลายเย็น และเขย่าอย่างแรง 1 นาที สังเกตว่ามีฟองรูปรวงผึ้งสูง 2 เซนติเมตร คงตัวนาน 30 นาที เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้ม 5 นาที ทิ้งให้เย็นเขย่าแรง ๆ 1 นาที ฟองจะหายไปและมีตะกอนเกิดขึ้น

<u>การทดสอบสีลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด</u>

นำสารที่สกัดได้จากข้อ 1 มา 2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำไปต้มบนเครื่องอังไอน้ำ 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง นำ

สารละลายที่กรองได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่โซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรอง นำสารละลายที่กรองไประเหยจนเกือบแห้ง แบ่งเป็น 2 ส่วน นำไปทดสอบสีแบบลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 2.2 ก.

2.5 การทดสอบคูมาริน

สารประเภทคูมาริน เมื่อละลายในเบสจะทำให้วงไพโรน (pyrone ring) แตกได้เกลือของแอนไอออนของกรดออร์โธไฮดรอกซีซินนามิก (o-hydroxycinnamic acid) ซึ่งเป็นแบบซิส (cis-form) ไม่เรืองแสง แต่เมื่อถูกแสงอุลตราไวโอเลตจะเปลี่ยนเป็นแบบทรานส์ (trans-form) ซึ่งจะเรืองแสงสีเขียวอมสีเหลืองได้ จึงอาศัยสมบัตินี้ในการทดสอบคูมาริน

ขั้นตอนการทดสอบ

นำหญ้าเกล็ดปลาแห้งบดละเอียด 3 กรัม ถ้าเป็นพืชแห้งทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นใส่ขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปิดทับอีกชั้นด้วยแผ่นอลูมิเนียม อุ่นบนเครื่องอังไอน้ำ 30 นาที นำกระดาษกรองที่ได้ไปวางไว้ใต้แสงอุลตราไวโอเลต สังเกตการเรืองแสงนาน 10 นาที

3. การแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์

3.1 การแยกสารสกัดเฮกเซน

นำสารสกัดเฮกเซนหนัก 10 กรัม มาแยกสารชนิดต่าง ๆ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยใช้ซิลิกาเจล 300 กรัม เป็นตัวดูดซับ (absorbent) แล้วชะด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับ ดังนี้ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน:คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 9:1, 4:1, 1:1, 1:3, 1:5 และ 1:7 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ แล้วค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยใช้คลอโรฟอร์มเพียงอย่างเดียว แล้วจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม:เมทานอล ในอัตราส่วน 3:1 และ 1:1 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ โดยเก็บส่วนที่ชะได้ (eluent) ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละส่วนมาระเหย

171620

ตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน

นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (thin layer chromatography) ซึ่งเคลือบด้วยซิลิกาเจล ใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เป็นตัวชะ หาตำแหน่งสารด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน และแยกสารต่อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

3.2 <u>การแยกสารสกัดเมทานอล</u>

นำสารสกัดเมทานอลหนัก 25 กรัม มาแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 625 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับ ดังนี้ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม : เอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 9:1, 8:2, 6:4, 4:6 และ 2:8 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ แล้วค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยใช้เอทิลแอซีเตต ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซีเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 8:2, 6:4, 4:6 และ 2:8 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ และเพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยใช้เมทานอล เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน

นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ซึ่งเคลือบด้วยซิลิกาเจล ใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เป็นตัวชะ หาตำแหน่งสารด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน และแยกสารต่อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

4. <u>การหาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์</u>

นำสารที่บริสุทธิ์มาหาโครงสร้างโดยใช้อุลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet Spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) และ แมสสเปกโทรสโกปี (Mass Spectroscopy)

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

1. ผลการสกัดสารจากหน้าเกล็ดปลา

ในการสกัดสารจากหน้าเกล็ดปลา 7 กิโลกรัม โดยวิธีแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน ได้สารสกัดเฮกเซนหนัก 100 กรัม แช่ในตัวทำละลายเมทานอล ได้สารสกัดหนัก 500 กรัม

2. ผลการทดสอบประเภทของสารอินทรีย์ในหน้าเกล็ดปลา

2.1 ผลการทดสอบอัลคาลอยด์

ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์ ใช้ปฏิกิริยาของอัลคาลอยด์กับรีเอเจนต์บางชนิดซึ่งจะให้ตะกอนที่เห็นชัดเจน ในที่นี้จะทดสอบกับรีเอเจนต์ 3 ชนิด คือ ดราเจนดอร์ฟ แวกเนอร์ และมาร์มรีเอเจนต์ ให้ผลการทดสอบดังตาราง 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์

| รีเอเจนต์ | สารสกัดเฮกเซน | สารสกัดเมทานอล |
|---|---|---|
| ดราเจนดอร์ฟ | + | ++ |
| แวกเนอร์ | + | ++ |
| มาร์ม | - | - |

หมายเหตุ ++ หมายถึง ตะกอนน้อย

+ หมายถึง ขุ่น

- หมายถึง ไม่มีตะกอน

ผลการทดสอบ แสดงว่าไม่น่าจะมีอัลคาลอยด์ในสารสกัดเฮกเซน แต่น่าจะมีอัลคาลอยด์ปริมาณเล็กน้อยในสารสกัดเมทานอล

2.2 ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ในการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ จะต้องใช้รีเอเจนต์ทดสอบองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ จะให้ผลทั้งส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ วงแลคโทน และน้ำตาล ปรากฏผลการทดสอบดังตาราง 2

ตาราง 2 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็น | |
|---|---|---|
| | สารสกัดเฮกเซน | สารสกัดเมทานอล |
| ก. ทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์<br>ข. ทดสอบส่วนที่เป็นวงแลคโทน<br>ค. ทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาล | สารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงจนเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว สารละลายให้สีชมพู ให้วงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้น สารละลายชั้นบนเป็นสีเขียวอ่อน | สารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงจนเป็นสีม่วงน้ำเงิน สารละลายให้สีเหลืองอ่อนอมส้ม ให้วงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้น สารละลายชั้นบนเป็นสีเขียวอ่อน |

ผลการทดสอบ แสดงว่า ไม่มีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่น่าจะมีส่วนที่เป็นสเตอรอยด์และน้ำตาลในสารสกัดทั้งจากเฮกเซน และเมทานอล

2.3 ผลการทดสอบฟลาโวนอยด์

ในการทดสอบฟลาโนวอยด์ ใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน กับลิวโคแอนโทไซยานิน ให้ผลการทดสอบดังตาราง 3

ตาราง 3 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็นจากสารสกัดเมทานอล |
|---|---|
| ไซยานิดิน | ชั้นออกทานอลมีสีน้ำตาลแดงถึงแดงเลือดหมู ชั้นน้ำให้สีส้ม |
| ลิวโคแอนโทไซยานิน | ให้สีน้ำตาลแดงปนเขียว |

ผลการทดสอบ แสดงว่า น่าจะมีฟลาโวนอล จากการทดสอบไซยานิดิน เนื่องจากให้สีน้ำตาลแดงถึงแดงเลือดหมูในชั้นออกทานอล และไม่น่าจะมีลิวโคแอนโทไซยานินอยู่ เนื่องจากไม่ให้สีม่วงแดงในสารละลาย

2.4 ผลการทดสอบซาโปนิน

ในการทดสอบซาโปนินจะใช้การทดสอบ 2 วิธีด้วยกัน คือ การทดสอบการเกิดฟอง กับการทดสอบสีโดยวิธีลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด ให้ผลการทดสอบดังตาราง 4

ตาราง 4 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็นจากสารสกัดเมทานอล |
|---|---|
| การทดสอบฟอง | เกิดฟองสูงประมาณ 1 เซนติเมตร และคงทนอยู่นาน 5 นาที เมื่อเติมกรดฟองไม่หายไปทันที และไม่เกิดตะกอน |
| การทดสอบสีลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด | สารละลายจะให้สีเขียวแกมน้ำเงิน |

ผลการทดสอบ จากการทดสอบฟองแสดงว่าไม่มีสารประเภทซาโปนิน และจากการทดสอบสีลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด แสดงว่า มีสารประเภทสเตอรอยด์

2.5 ผลการทดสอบคูมาริน

ในการทดสอบคูมาริน จะสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งปรากฏผลการทดสอบดังนี้

ผลการทดสอบ ไม่เกิดการเรืองแสงที่บริเวณกระดาษกรอง แสดงว่าไม่มีคูมารินในหญ้าเกล็ดปลา

3. ผลการแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์

3.1 ผลการแยกสารสกัดเฮกเซน

ในการนำสารสกัดเฮกเซนหนัก 10 กรัม มาแยกสารต่าง ๆ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว โดยเก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลการตรวจสอบดังตาราง 5

ตาราง 5 ผลการแยกสารสกัดเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

| สารที่เป็นตัวชะ/อัตราส่วนที่ชะ | | ส่วนที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| เฮกเซน | | 1 | เป็นสารเหนียวสีขาวขุ่น |
| | | 2-3 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาล |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | (9:1) | 4-6 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน |
| | (4:1) | 7-9 | เป็นสารเหนียวสีเหลืองเข้ม |
| | (1:1) | 10-11 | เป็นสารเหนียวสีเหลืองอ่อน |
| | (1:3) | 12-14 | เป็นสารเหนียวข้นมีของแข็ง เม็ดเล็ก ๆ สีเหลืองปนขาว |
| | (1:5) | 15-20 | เป็นสารเหนียวสีเหลืองปนเขียว |
| | (1:7) | 21-25 | เป็นสารเหนียวสีเขียวเข้มมีผลึกรูปเข็มสีขาวปนเป็นจำนวนมาก |
| คลอโรฟอร์ม | | 26-29 | เป็นสารเหนียวสีเขียวเข้มออกดำ |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | (3:1) | 30-31 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาล |
| | (1:1) | 32-35 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม |

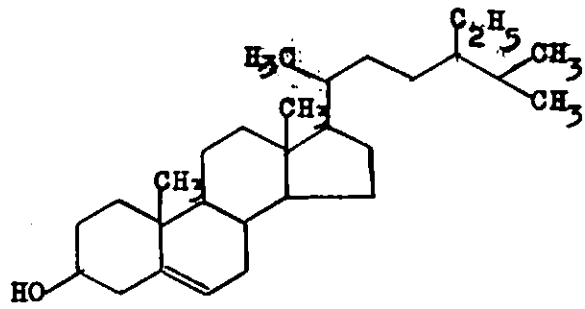
สารในขวดส่วนที่ 21-25 ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มในสารเหนียวสีเขียว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งได้สารหนัก 2.67 กรัม นำมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อ โดยใช้คอลัมน์ขนาดกลาง มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลหนัก 106.8 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้ เฮกเซน:คาร์บอนเตตระคลอไรด์:เอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 9:9:2, 8:9:3 และ 6:9:3 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ แล้วจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างคาร์บอนเตตระคลอไรด์:เอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 9:1, 7:3, 5:5 และ 2:8

(โดยปริมาตร) ตามลำดับ ค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้เอทิลแอซีเตตเพียงอย่างเดียว แล้วจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซีเตต:เมทานอล ในอัตราส่วน 9.5:0.5 (โดยปริมาตร) และเพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยใช้เมทานอล เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน

นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลปรากฏว่า เก็บสารทั้งหมดได้ 31 ส่วน ในส่วนที่ 15–17 ชะด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์:เอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 7:1 ได้สารมีลักษณะเป็นของแข็งละเอียดสีขาวปนกับสารเหนียวสีเขียว นำมาล้างด้วยเฮกเซนเย็นได้ผลึกสีขาวรูปเข็ม แล้วตกผลึกใหม่ในเอทิลแอซีเตตได้ผลึกรูปเข็มหนัก 400 มิลลิกรัม $R_f$ = 0.26 (ซิลิกาเจล/คาร์บอนเตตระคลอไรด์: เอทิลแอซีเตต (9:1) มี m.p. = 140–141 ° C

3.2 <u>การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์</u>

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (m.p. = 140–141 ° C) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม และ เอทิลแอซีเตต แต่ไม่ละลายในเมทานอล นำมาวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ได้ค่า $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 230 nm (อยู่ในช่วงสารประเภทสเตอรอยด์) ปรากฏพีคดังภาพประกอบ 15 ในภาคผนวก หาค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ได้ค่า $\nu_{max}^{KBr}$ ($cm^{-1}$) 3400 (O–H streching) 2950 (C–H streching ใน $CH_3$) , 1460 ($CH_2$ streching), 1380 (C–C streching) 1050–960 (C–O streching) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 16 ในภาคผนวก วิเคราะห์ $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า $\delta$ 0.68–2.30 (CH, $CH_2$, $CH_3$), 3.5 (OH) 5.09 (–CH=CH) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 17 ในภาคผนวก และแมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e 414 ($M^+$), 393, 381, 329, 303, 273, 255 และ 213 ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 18 ในภาคผนวก จากข้อมูลดังกล่าวเทียบกับสเปกตรัมมาตรฐานในภาพประกอบที่ 19–20 สรุปได้ว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{50}O$ คือ เบตา-ไซโตสเตอรอล และมีโครงสร้างดังนี้



เบตา-ไซโตสเตอรอล

3.3 ผลการแยกสารสกัดเมทานอล

ในการนำสารสกัดเมทานอลหนัก 25 กรัม มาแยกสารต่าง ๆ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว โดยเก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟี-แบบเยื่อบาง รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลการตรวจสอบดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการแยกสารสกัดเมทานอลโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

| สารที่เป็นตัวชะ/อัตราส่วนที่ชะ | | ส่วนที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม | | 1-2 | เป็นสารเหนียวใส |
| คลอโรฟอร์ม: เอทิลแอซีเตต | (9:1) | 3-6 | เป็นสารเหนียวสีเหลือง |
| | (8:2) | 7-10 | เป็นสารเหนียวสีเหลืองอ่อน |
| | (6:4) | 11-13 | เป็นสารเหนียวสีเขียวอ่อน |
| | (4:6) | 14-16 | เป็นสารเหนียวสีเขียวเข้ม |
| | (2:8) | 17-20 | เป็นสารเหนียวสีเขียวเข้มปน ของแข็งเม็ดเล็ก ๆ สีเหลืองปนขาว |
| เอทิลแอซีเตต | | 21-23 | เป็นสารเหนียวสีเขียวปนน้ำตาล |
| เอทิลแอซีเตต: เมทานอล | (8:2) | 24-27 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน |
| | (6:4) | 28-30 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลแดง |
| | (4:6) | 31-33 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเหลือง ปนกับของแข็งเป็นเม็ดเล็ก ๆ |
| | (2:8) | 35-38) | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้มกับ ตะกอนเล็กน้อย |
| เมทานอล | | 39-42 | เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลดำ |

สารในขวดส่วนที่ 17-20 มีลักษณะเป็นของแข็งเม็ดเล็กสีขาวปนอยู่กับสารเหนียวสีเขียว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งหนัก 1.75 กรัม นำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลหนัก 88 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้ คลอโรฟอร์ม แล้วจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง

คลอโรฟอร์ม:เอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, และ 1:9 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ ค่อย ๆ เพิ่มขั้วตัวทำละลายโดยใช้เอทิลแอซีเตตเพียงอย่างเดียว แล้วจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซีเตต:เมทานอล ในอัตราส่วน 9:1, 7:3, 5:5, 3:7 และ 1:9 (โดยปริมาตร) และเพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยใช้เมทานอล เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน

นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลปรากฏว่าเก็บสารทั้งหมดได้ 60 ส่วน ในส่วนที่ 12-15 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม:เอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 9:1 ได้สารมีลักษณะเป็นแผ่นแข็งสีขาวปนกับสารเหนียวสีเขียว ล้างออกด้วยเมทานอลได้ผลึกสีขาว นำมาตกผลึกใหม่ด้วยเอทิลแอซีเตตได้ผลึกรูปเข็มหนัก 13 มิลลิกรัม $R_f$ = 0.25 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) มี m.p. = 140°-142° C

และในส่วนที่ 31-33 ชะด้วย เอทิลแอซีเตต:เมทานอล ในอัตราส่วน 4:6 ได้สารเหนียวสีน้ำตาลเหลืองปนกับของแข็งเม็ดเล็ก ๆ ล้างด้วยเมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ได้ของแข็งสีขาวเป็นเม็ดละเอียดจำนวนมากหนัก 13.87 กรัม ซึ่งไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ละลายในน้ำเมื่อนำไปทดสอบกับรีเอเจนต์ที่ทดสอบโซเดียม (ภาคผนวก) จะให้ตะกอนสีเหลือง ทำให้สรุปได้ว่าได้สารประกอบเกลือโซเดียม

3.5 <u>การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์</u>

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (m.p. = 140°- 142°C) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มและเอทิลแอซีเตต และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ปรากฏผลเช่นเดียวกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดเฮกเซน คือ เบตา-ไซโตสเตอรอล

# บทที่ 5

## สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลาโดยใช้เฮกเซน และเมทานอล เป็นตัวทำละลายตามลำดับ

2. เพื่อทดสอบประเภทของสารอินทรีย์บางชนิด

3. เพื่อทำการแยกสารที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง

ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า

1. ใช้เฮกเซน และเมทานอล เป็นตัวทำละลายตามลำดับในการสกัดสารบางชนิดจากหญ้าเกล็ดปลา

2. ทดสอบอัลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน จากสารสกัดเฮกเซน และเมทานอล

3. แยกสารบางชนิดที่ได้จากการสกัดโดยวิธีโครมาโทกราฟี

4. ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล

1. การสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลา โดยวิธีการแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอลตามลำดับ เพื่อนำสารที่สกัดได้มาทดสอบประเภทของสารอินทรีย์ และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

2. ทดสอบประเภทของสารอินทรีย์แต่ละชนิด โดยแบ่งเป็น

2.1 ทดสอบอัลคาลอยด์ ด้วยรีเอเจนต์ ดราเจนดอร์ฟ แวกเนอร์ และมาร์ม

2.2 ทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ด้วยปฏิกิริยาลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด เคดด์รีเอเจนต์และปฏิกิริยาเคลเลอร์-คิไลนี

2.3 ทดสอบฟลาโวนอยด์ โดยใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน กับลิวโคแอนโทไซยานิน

2.4 ทดสอบซาโปนิน โดยใช้การทดสอบฟอง กับการทดสอบสีแบบลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด

2.5 ทดสอบคูมาริน โดยใช้สมบัติการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

3. การแยกสารสกัดเฮกเซน และเมทานอลโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4. ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

<u>สรุปผลการศึกษาค้นคว้า</u>

1. การสกัดสารจากหญ้าเกล็ดปลา 7 กิโลกรัม โดยวิธีแช่ในตัวทำละลาย ได้สารสกัดเฮกเซนหนัก 100 กรัม และสารสกัดเมทานอล หนัก 500 กรัม

2. การทดสอบประเภทของสารอินทรีย์ทั้ง 5 ประเภท พบว่ามี สเตอรอยด์ ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์อยู่ปริมาณเล็กน้อย แต่ไม่พบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซาโปนิน และคูมาริน

3. การแยกสารจากสารสกัดเฮกเซน พบว่ามีสารประเภทสเตอรอยด์อยู่ จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่าสารนั้นเป็น เบตา-ไซโตสเตอรอล

4. การแยกสารจากสารสกัดเมทานอล พบ เบตา-ไซโตสเตอรอล ปริมาณเล็กน้อย และสารประกอบเกลือโซเดียม ซึ่งไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ละลายได้ดีในน้ำ

<u>อภิปรายผลการทดลอง</u>

1. ในการแยกสารครั้งนี้ ไม่พบสารประเภทฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ อาจเป็นเพราะมีสารประเภทนี้อยู่น้อยมากยากต่อการสกัดออกมาได้ การที่พืชสะสมสารไว้มาก

หรือน้อยขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ส่วนของพืชที่นำมาศึกษากับช่วงเวลาในการเก็บที่แตกต่างกัน ถ้าต้องการใช้ดอกต้องเริ่มเก็บตอนดอกแรกบานและเก็บในตอนเช้า เพราะพืชยังสะสมสารอยู่มาก ถ้าเป็นประเภทต้น เปลือก ใบ จะมีน้ำสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ต้องเก็บในตอนกลางวัน หรือช่วงฤดูร้อน นอกจากนี้อายุของพืชที่นำมาศึกษาก็มีผลเช่นกัน ถ้าเป็นไม้ยืนต้น พืชจะสะสมสารไว้ในปริมาณที่มากกว่าพืชตระกูลหญ้า ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่เป็นสาเหตุที่ทำให้การสะสมสารสำคัญของพืชอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน

2. การแยกสารจากสารสกัดเฮกเซน สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด และพบว่าเป็น เบตา-ไซโตสเตอรอล ซึ่งเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ ตรงกับผลการทดสอบเบื้องต้นดังที่กล่าวมาแล้ว สารเบตา-ไซโตสเตอรอลนี้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมน

3. การแยกสารจากสารสกัดเมทานอล พบเบตา-ไซโตสเตอรอล และสารประกอบเกลือโซเดียมอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลงานของ สุภาลักษณ์ และโยชิดา ในการทำการวิเคราะห์ธาตุในสมุนไพร พบว่า หญ้าเกล็ดปลามีโซเดียมอยู่ในปริมาณมากที่สุด

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ควรสกัดและแยกสารประเภทอื่น เช่น พวกน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการต้มกลั่นไอน้ำ เนื่องจากพืชวงศ์นี้มีสารพวกน้ำมันหอมระเหยอยู่เป็นจำนวนมาก และอาจนำน้ำมันหอมระเหยไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

2. ควรทดสอบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของน้ำยาสกัดหญ้าเกล็ดปลาโดยต้มกับน้ำใช้กับสัตว์ทดลอง เพื่อใช้ข้อมูลที่ได้สำหรับการสกัด และแยกสารบริสุทธิ์ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3. ควรทำการทดสอบสารประกอบเกลือโซเดียมต่อไปว่าได้เกลือโซเดียมของอะไร

4. สำหรับผู้สนใจนำทำซ้ำโดยการเพิ่มสารตั้งต้นในการสกัดให้มากกว่านี้

# บรรณานุกรม

# บรรณานุกรม


ชมรมพฤกษเคมี. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกษเคมี ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยมหิดล : คณะวิทยาศาสตร์. 2521, 1 เล่ม. (หน้าไม่ติดต่อกัน)

_____. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกษเคมี ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยมหิดล : คณะวิทยาศาสตร์. 2523.

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคนอื่น ๆ. สมุนไพร. หน้า 213. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร, 2523.

เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). หน้า 208. กรุงเทพฯ : พันนีพันบลัชชิ่ง, 2523.

นพรัตน์ พัฒนเงิน. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรบางชนิด. หน้า 44. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร : 2527.

นันทวัน บุณยะประภัศร. ก้าวไปกับสมุนไพร. หน้า 5. กรุงเทพฯ : ธรรกมลการพิมพ์. ม.ป.ป.

สมบัติ พุ่มสาขา. การศึกษาผลของสมุนไพรต่อหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยแอลลอกซาน. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล และ Z. Yoshida. "การวิเคราะห์ธาตุในสมุนไพรโดย Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry." วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. หน้า 31-35. กรุงเทพฯ : 2531.

เสนาะ บุญมี. อนุกรมวิธานของพืชมีดอก. หน้า 216. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม : คณะวิทยาศาสตร์, 2529.

อุไรวรรณ ประยูรรัตน์ และคนอื่น ๆ. การสำรวจวัชพืชสมุนไพรในจังหวัดชลบุรี. หน้า 5-193: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตบางแสน : คณะวิทยาศาสตร์, 2524.

Avadhoot, Y., V.K. Dixit. and K.C. Varma. "Preliminary chemical examination of seeds of Lantana camara var aculeata Linn." Chemical Abstracts. 92(4) : 399, January, 1980.

Bianco, A.M. and others, "Iridoid and phenylpropanoid glycosides from new source," Journal of Natural Products. 47(2) : 901, July/December, 1984.

Chogo, J. and G. Crank. "Essential oil and leaf constituents of Lippia Ukambensis from Tanzania," Journal of Natural Products. 45(2) : 186-188, March/April, 1982.

Craveiro, A.A. and others. "Essential oil from Brazillian Verbenaceae genus Lippia," Journal of Natural Products. 44(5) : 598-600, July/August, 1981.

Elakovich, S.D. and K.L. Stevens, "Volatile constituents of Lippia nodiflora," Journal of Natural Products. 48(3) : 504-505, May/August, 1985.

Feigl, F. Spot Tests in Inorganic Analysis. p.229-230. Elsevier publishing company, 1958.

Ford, C.V. and M.R. Bendall. "Identification of the iridoid glucoside theveside in Lantana camara (Verbenaceae) and determination of its structure and stereochemistry by means of NMR," Chemical Abstracts. 93(5) : 499, August, 1980.

Garnier, J. "Chemical study of two Guyanan Verbenaceae : Stachytarpheta guyanensis Vahl. and Stachytarpheta mutabilis Vahl.," Chemical Abstracts. 89(9) : 223, August/September, 1978.

Grevenstuk, A. and F.W. Myreyen, "Common medicinals of the East Indian Archipelago-V. Orthosiphon grandiflorous Bold," Biological Abstracts. 15 : 1610, June/December, 1941.

Jefferies, P.R. and T. Ratajczak. "Isopimara-9(11),15-diene-3-B, 19-diol from Newcastlia viscida (Verbenaceae)," Chemical Abstracts. 78(7) : 514, February, 1973.

Macambira, L.M.A. and others. "Naphthoquinoids from Lippia sidoides," Journal of Natural Products. 49(2) : 310-312, January/June, 1986.

Martha, W. and others. The Merck Index tenth edition. : U.S.A., 1983.

Nair, A.G. and others. "Polyphenolic components of Clerodendrum serratum," Chemical Abstracts. 91(5) : 319, July/August, 1979.

Neudert, W. and H. Ropke. Steroid-Spektrenatlas Atlas of Steriod Spectra. no. 844. Germany, 1965.

Pouchert, C.T. and J.R. Campbell. The Aldrich Library of NMR spectra. p.101 D. Aldrich chemical Company., U.S.A. 1974.

Rangaswami, Srinivasa. and S. Sarangan. "Sapogenins of Clerodendron serratum. Constitution of a new pentacyclic triterpene acid, serratagenic acid," Chemical Abstracts. 71(21) : 377, November/December, 1969.

Scott, A.I. Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products. p.371. Pergamon Press, Germany, 1964.

Subranian, P.M. and G.S. Misra. "Flavonoids of Vitex negundo," Journal of Natural Products. 42(5) : 540-542, May/December, 1979.

Tiwari, K.P., M. Masood. and P.K. Minocha. "Chemical constituents of Gmelina phillipinensis, Adenocalymna nitida, Allamanda cathartica, Averrhoa carambola and Maba buxifolia," Chemical Abstracts. 93(2) : 309, July, 1980.

Werawattanametin, K., V. Podimuang. and A. Suksamrarn. "Ecdysteroids from Vitex Glabrata," Journal of Natural Products. 49(2) : 365, January/June, 1986.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก

## การเตรียมรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบประเภทของสารอินทรีย์

1. รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบอัลคาลอยด์

1.1 ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์

ละลายบิสมัสไนเตรต 8 กรัม ในสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 12 ลูกบาศก์-เซนติเมตร ผสมกับสารละลายโปแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์-เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.2 แวกเนอร์ รีเอเจนต์

ละลายโปแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมไอโอดีน 1.27 กรัม ลงในสารละลายคนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.3 มาร์ม รีเอเจนต์

ละลายแคดเมียมไอโอไดด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับสารละลายโปแทสเซียมไอโอไดด์ 20 กรัม ในน้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

2.1 เคลย์ รีเอเจนต์

ละลายกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก 1 กรัม ในเมทานอล 100 ลูกบาศก์-เซนติเมตร

2.2 เคลเลอร์-คีไลนี

เติมสารละลายกรดแอซีติกบริสุทธิ์ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น ร้อยละ 10 จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

การเตรียมน้ำยาสกัดตำรับยา พระวัย จตุตาลัย

1. ข้าวเย็นเหนือ-ข้าวเย็นใต้
2. เชือกเขาหนัง
3. ทองพันชั่ง
4. พญารากดำ
5. แก่นไม้สัก
6. หัวร้อยรู
7. หญ้าเกล็ดปลา

นำสมุนไพรทั้ง 7 ที่ตากแห้งบดละเอียดอย่างละ 7.5 กรัม ต้มกับน้ำกลั่น 240 มิลลิลิตร ให้เดือดนาน 10 นาที กรองเอาน้ำยาสกัดไว้ใช้ต่อไป

รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบโซเดียม

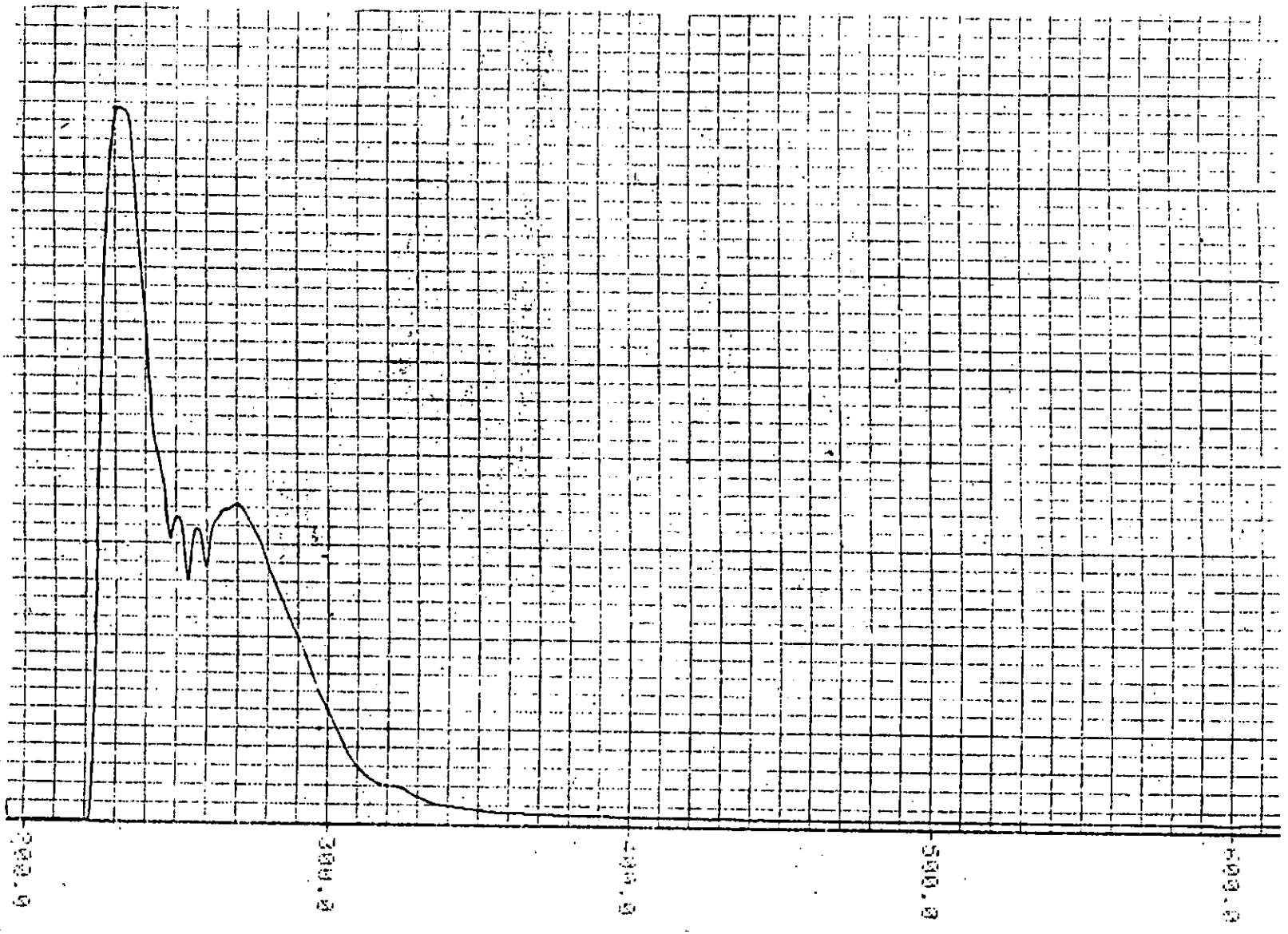
1. ยูเรนิลแอซีเตต (uranyl acetate) 10 กรัม ละลายในสารละลายกรดแอซีติก (acetic acid) เข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ จำนวน 6 กรัม เจือจางด้วยน้ำให้ครบ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอุ่นให้ละลาย

2. ซิงก์แอซีเตต (zinc acetate) 30 กรัม ละลายในสารละลายกรดแอซีติกเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ จำนวน 3 กรัม เจือจางด้วยน้ำให้ครบ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอุ่นให้ละลาย

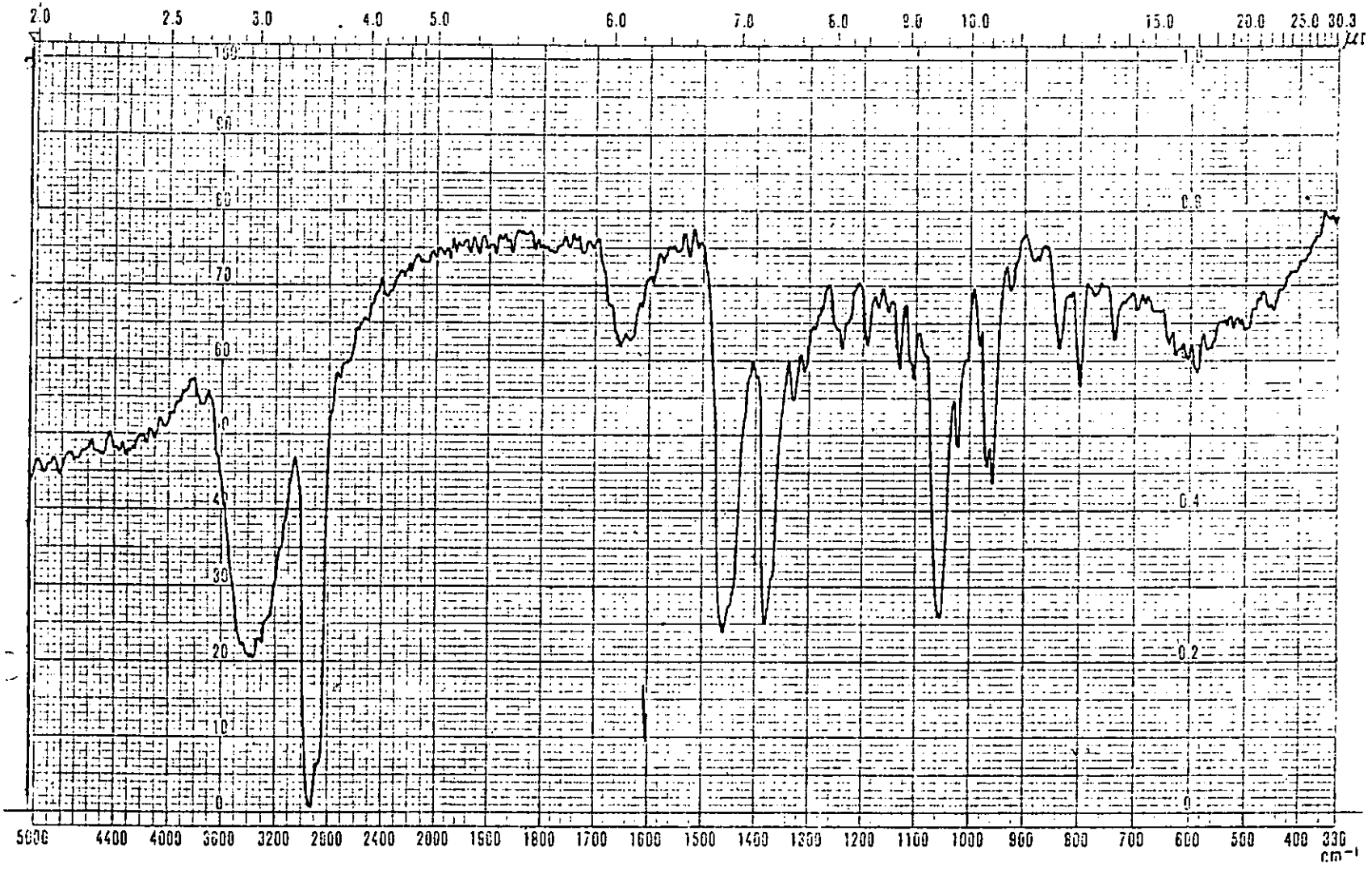
นำสารละลายในข้อ 1 และ ข้อ 2 ผสมกัน นำไปอุ่นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรอง และเก็บไว้ใช้ทดสอบ

วิธีทดสอบโซเดียม

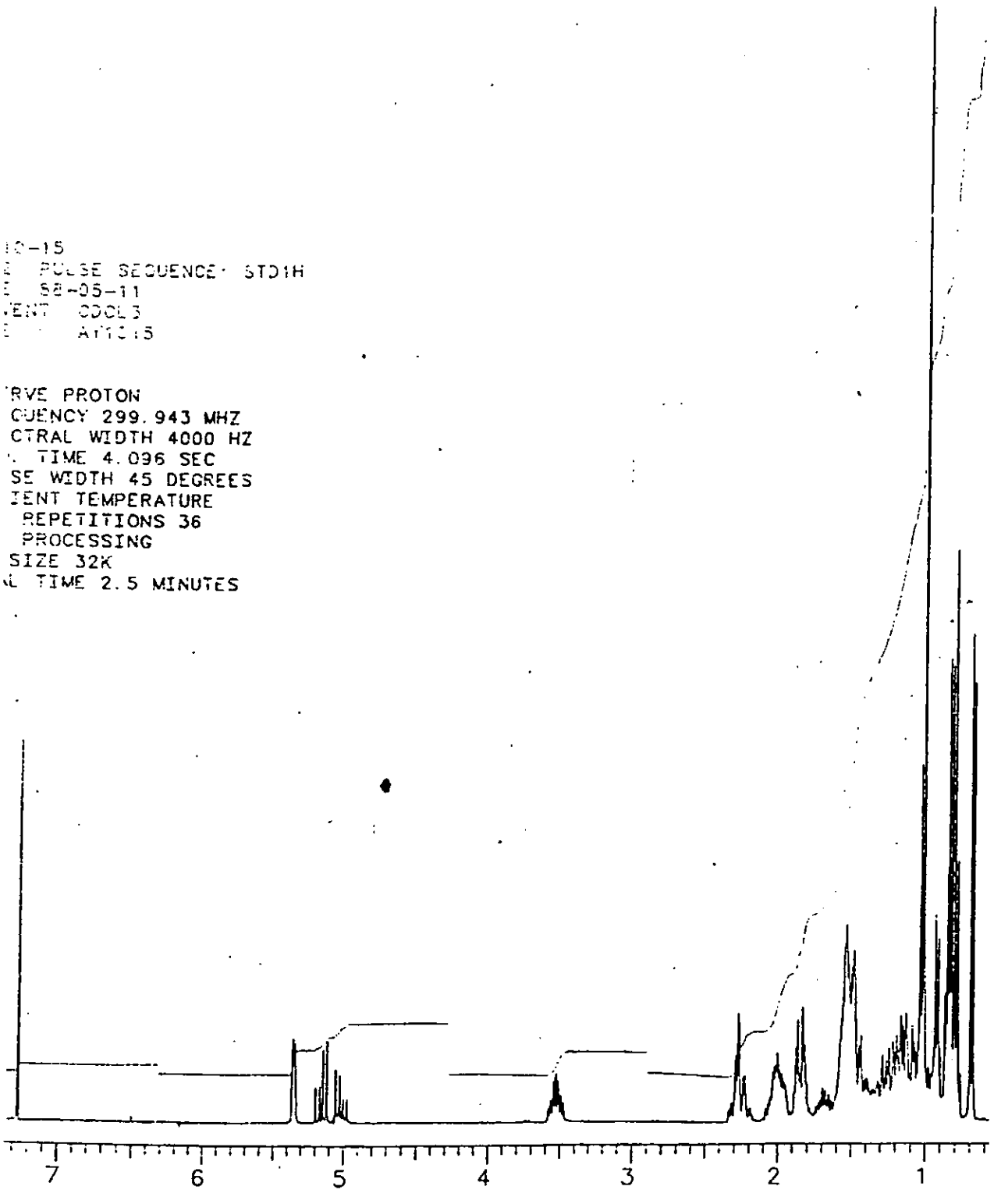
หยดสารละลายที่ต้องการทดสอบ 1 หยด ลงในกระจกนาฬิกา และหยดรีเอเจนต์ 8 หยด จะมีตะกอนขุ่นสีเหลืองเกิดขึ้น



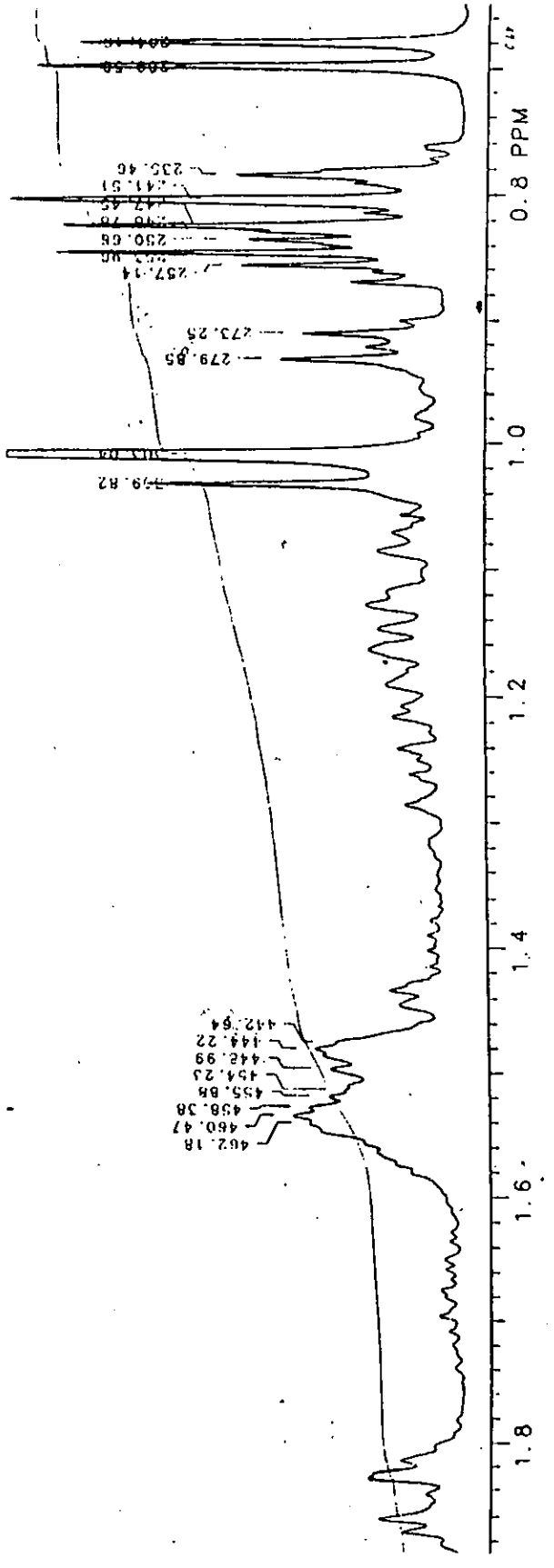
ภาพประกอบ 15 แสดงพีคที่วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต



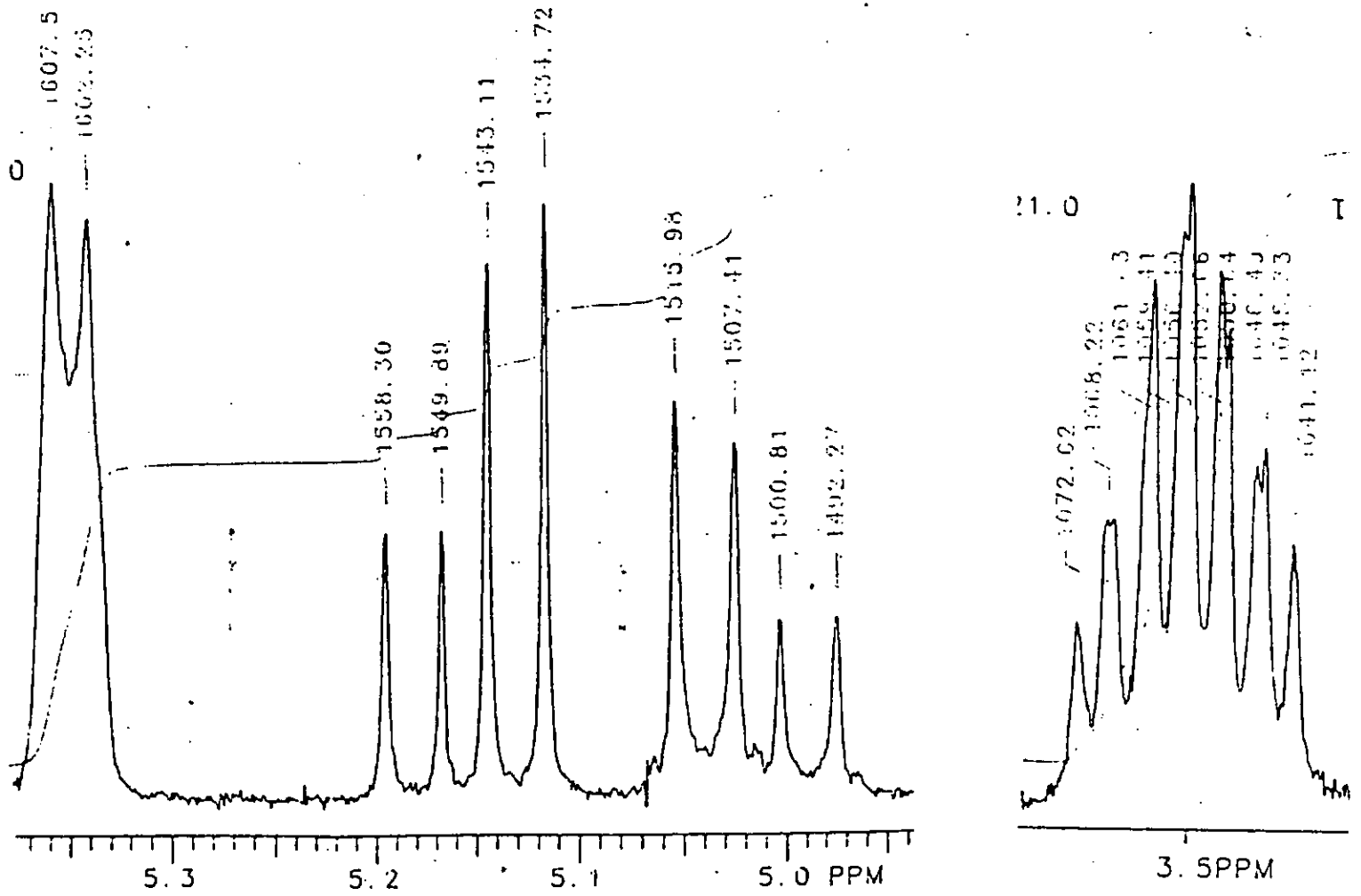

ภาพประกอบ 16 แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด



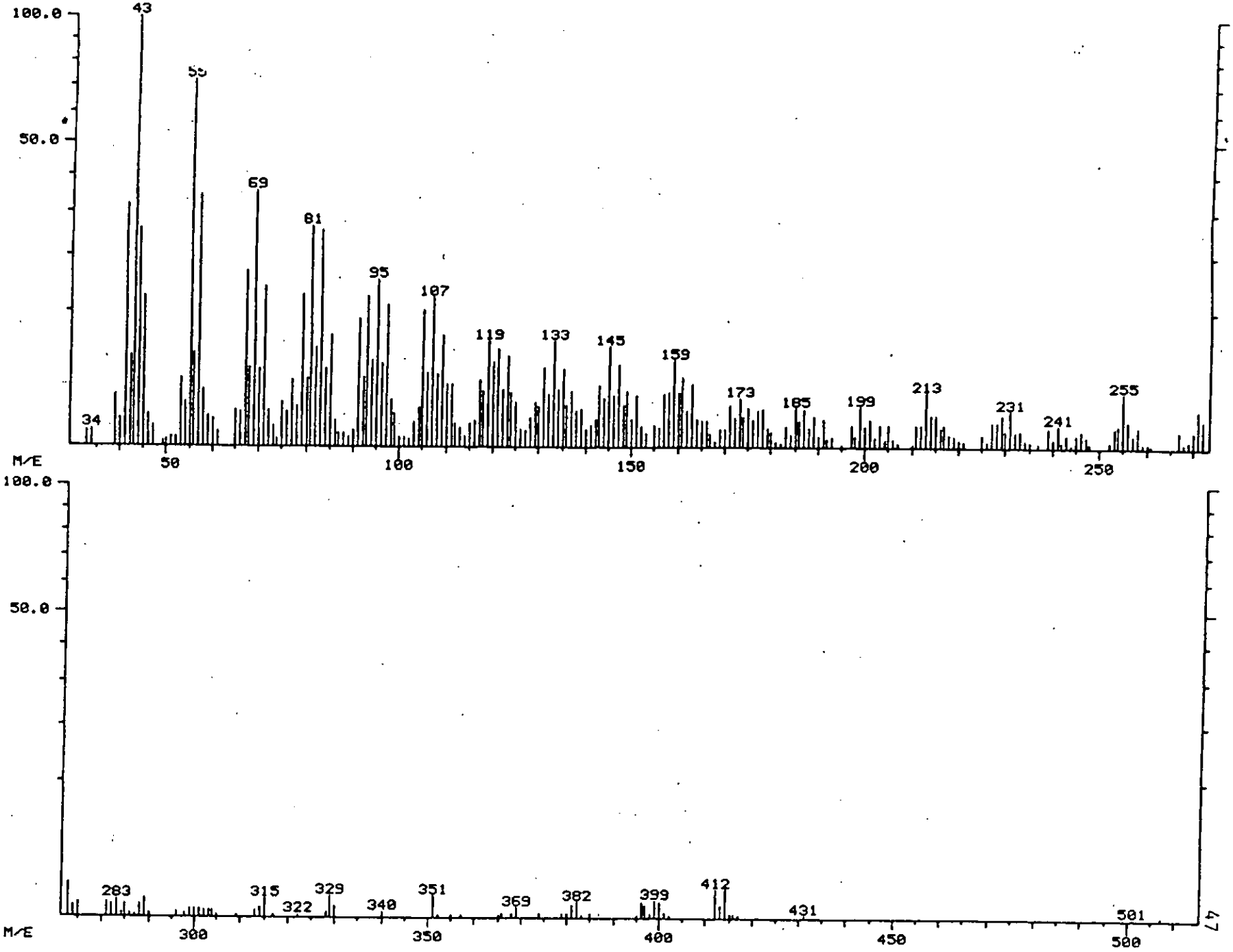

ภาพประกอบ 17 แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ $^{1}H$ NMR



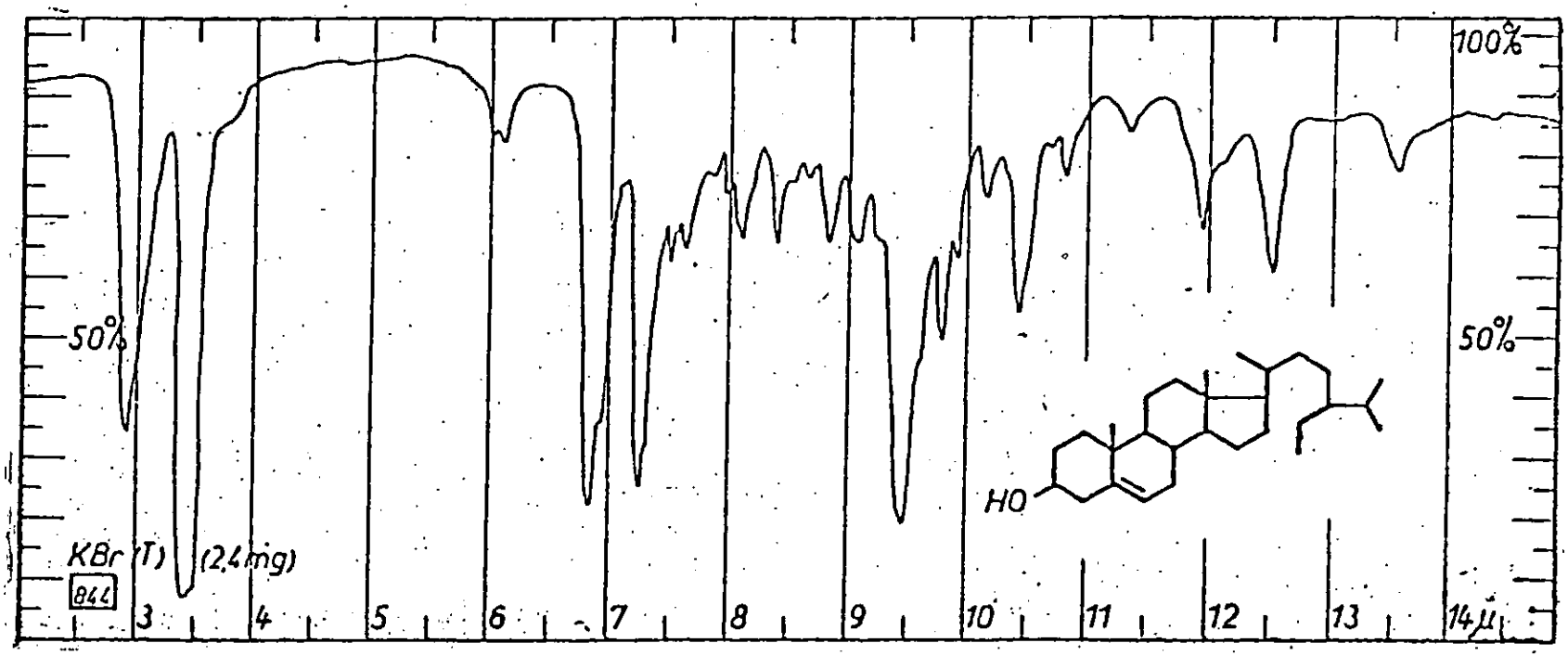

ภาพประกอบ 17 แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ $^1$H NMR



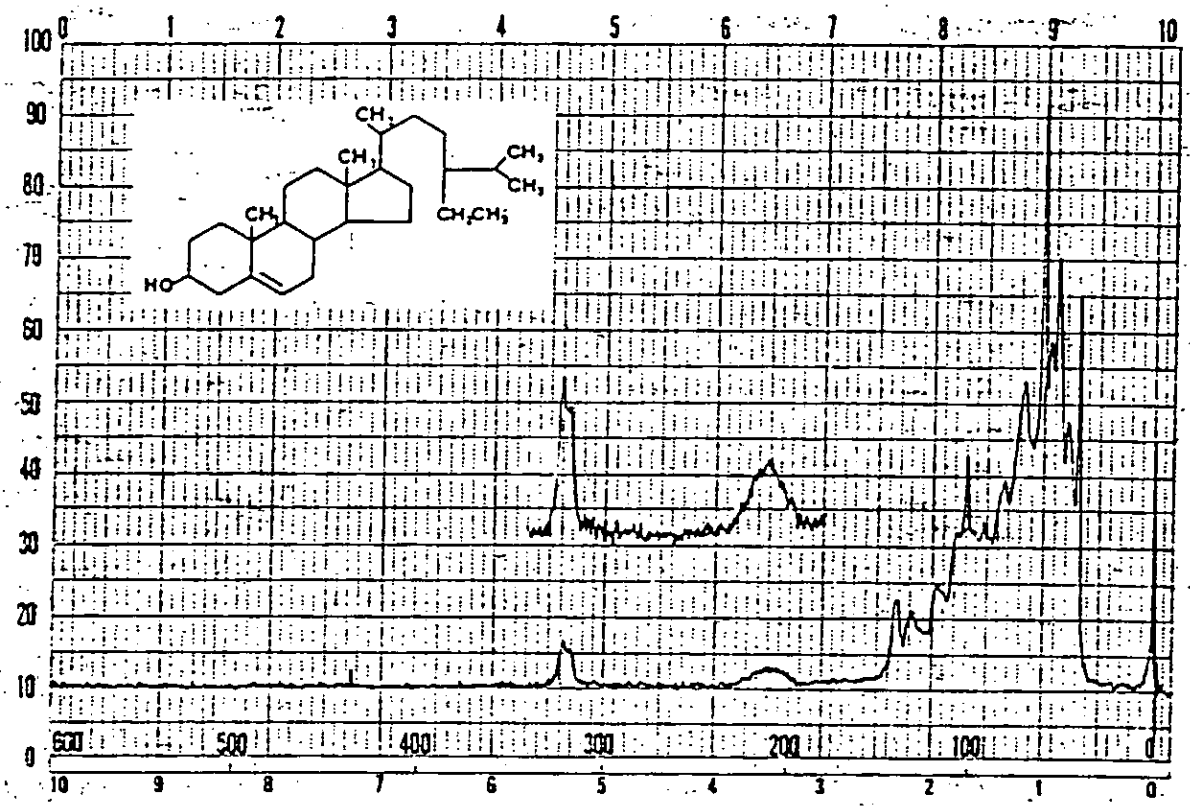

ภาพประกอบ 17 แสดงสเปกตรัมที่วิเคราะห์ $^{1}H$ NMR




ภาพประกอบ 18 แสดงแมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ค่า m/e




ภาพประกอบ 19 แสดงสเปกตรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอินฟาเรดของ เบตา-ไซโตสเตอรอล




ภาพประกอบ 20 แสดงสเปกตรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์ $^{1}H$ NMR ของเบตา-ไซโตสเตอรอล

# ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวอาวียา ชื่อสกุล แย้มผกา

เกิดเมื่อวันที่ 25 เดือนสิงหาคม พุทธศักราช 2506

สถานที่เกิด อำเภอบางเขน จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 111/11 ซอยเธียรสวนนิเวศน์
ถนนวิภาวดีรังสิต ตำบลลาดยาว
อำเภอบางเขน จังหวัดกรุงเทพมหานคร
10900

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2525 เตรียมอุดมศึกษา (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนดรุณพิทยา

พ.ศ.2528 กศ.บ. เกียรตินิยมอันดับ 2 (วิชาเอกวิทยาศาสตร์-เคมี)
จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน

พ.ศ.2532 กศ.ม. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร