583.720419
ก7730
ว.3

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจากรากพุดน้อย

ปริญญานิพนธ์

ของ

เกศริน ทีฆายุ

27 พ.ย. 2533

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
เมษายน 2533

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

171168

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธาน
(รศ.เกษร พะลัง)

.....กรรมการ
(อ.สมคิด เกษรสมบุญ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(รศ.เกษร พะลัง)

.....กรรมการ
(อ.สมคิด เกษรสมบุญ)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผศ.ดร.สุนันท์ ชุนชาติประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)
วันที่ 3 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2533

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.เกษร พะลัง ดร.จินดา ว่องไวจินดนา อาจารย์สมคิด เกษรสมบุญ ผศ.ดร.สุนันท์ ชุนชาติประเสริฐ และ ผศ.ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยลุนด์ ประเทศสวีเดน ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการวิเคราะห์สาร ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณวนิภา นาคลดา คุณอาริยา แย้มผกา พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ พี่และญาติมิตรทุกท่านที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือผู้วิจัยจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

เกศริน ทีฆายุ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	6
3	วิธีดำเนินการทดลอง	12
	การทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสาร	12
	การทดสอบแอลคาลอยด์	12
	การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	13
	การทดสอบซาโปนิน	14
	การทดสอบฟลาโวนอยด์	15
	การทดสอบคูมาริน	16
	การสกัดสารออกจากรากพุดน้อย	18
	การแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์	18
	การแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล	18
	การแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผลสกัดด้วยน้ำ	19
	การวิเคราะห์สาร	19
4	ผลการทดลอง	22
	ผลการทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสาร	22
	ผลการทดสอบแอลคาลอยด์	22

บทที่		หน้า
4	ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	23
	ผลการทดสอบซาโปนิน	23
	ผลการทดสอบฟลาโวนอยด์	24
	ผลการทดสอบคูมาริน	24
	ผลการสกัดสารออกจากรากพุดน้อย	25
	ผลการแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์	25
	ผลการแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล	25
	ผลการแยกผลสกัดดิบแอลคาลอยด์และการทำให้บริสุทธิ์	25
	ผลการแยกผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตและการทำให้บริสุทธิ์ ..	27
	ผลการแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผลสกัดด้วยน้ำ	29
	ผลการแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและการทำให้บริสุทธิ์ ...	29
	ผลการแยกผลสกัดด้วยน้ำ	31
	การวิเคราะห์สาร	31
	การวิเคราะห์สาร ก.	31
	การวิเคราะห์สาร ข.	32
	การวิเคราะห์สาร ค.	34
	การวิเคราะห์สาร ง.	36
5	สรุปและอภิปรายผล	56
	สรุปผล	56
	อภิปรายผล	56
บรรณานุกรม		60
ภาคผนวก		64
ประวัติย่อของผู้วิจัย		66

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์	22
2	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	23
3	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน	24
4	ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์	24
5	ผลการแยกผลสกัดดิบแอลคาลอยด์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ...	26
6	ผลการแยกผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ..	28
7	ผลการแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ..	30

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	โครงสร้างของ 14-คีโตอัลลโทนิดีน	7
2	โครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบของ *Pterotaberna inconspicua*	9
3	โครงสร้างของไอโซวาลเลเซียโคตามีน	10
4	โครงสร้างของวินคาดีน	11
5	แผนภูมิแสดงการทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสาร	17
6	แผนภูมิแสดงการสกัด การแยก และการทำสารจากรากพุดน้อยให้บริสุทธิ์	20
7	แผนภูมิแสดงการแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล	21
8	สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ก.	37
9	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ก.	38
10	แมสสเปกตรัมของสาร ก.	39
11	สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ข.	40
12	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ข.	41
13	แมสสเปกตรัมของสาร ข.	42
14	สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.	43
15	^{1}H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.	44
16	^{13}C NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.	45
17	แมสสเปกตรัม ของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.	46
18	สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ค.	47
19	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ค.	48
20	แมสสเปกตรัมของสาร ค.	49

ภาพประกอบ หน้า

21 แก๊สลิควิดโครมาโทแกรมของสาร ค.

ก. พีคของคอเลสเตอรอล แคมเปสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และเบต้า-ไซโตสเตอรอล ตามลำดับ

ข. พีคของสาร ค. 50

22 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ง. 51

23 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ง. 52

24 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร ง. 53

25 แมสสเปกตรัมของสาร ง. 54

26 แก๊สลิควิดโครมาโทแกรมของสาร ง.

ก. พีคของคอเลสเตอรอล แคมเปสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และเบต้า-ไซโตสเตอรอล ตามลำดับ

ข. พีคของสาร ง. 55

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางการแพทย์และเภสัชวิทยาได้เจริญก้าวหน้ามากขึ้น โดยมีการผลิตยาสำเร็จรูปขึ้นมาใช้รักษาโรคต่างๆ ได้รวดเร็วและให้ผลการรักษาที่ดี แต่พบว่าการใช้ยาแผนปัจจุบันเป็นเวลานาน อาจมีผลข้างเคียงหรือเกิดอาการดื้อยาได้ ทำให้การรักษาโรคด้วยสมุนไพรกลับมาได้รับความสนใจอีกครั้งหนึ่ง และมีแนวโน้มว่าปริมาณการใช้จะมากขึ้นในอนาคต ทำให้มีการศึกษาวิจัยสมุนไพรกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านสมบัติทางยา(therapeutic value) การทดสอบทางเภสัชวิทยา(pharmacology) และการศึกษาทางเคมีเกี่ยวกับการแยกสารสำคัญ การทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ และการหาสูตรโครงสร้างของสาร

การศึกษาสารประกอบที่สำคัญในสมุนไพรเริ่มตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 19 สารตัวแรกที่พบ คือ นาร์โคติน (narcotine) ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ในฝิ่น พบโดยเดอรอสเน (Derosne) ในปี ค.ศ.1803 ต่อมาในปี ค.ศ.1805 เซอร์ทูเนอร์(Sertuner) เภสัชกรชาวเยอรมัน ได้ทำการแยกมอร์ฟีนออกจากฝิ่น ซึ่งนับเป็นการค้นพบครั้งสำคัญที่ทำให้มีการเปลี่ยนแนวการรักษาโรคจากการใช้ส่วนต่างๆ ของสมุนไพรโดยตรง มาเป็นการใช้สารสำคัญ (active constituents) จากสมุนไพรแทน ในระหว่างปี ค.ศ.1820-1850 มีการศึกษาสารประกอบสำคัญจากสมุนไพรมากขึ้น เป็นเหตุให้พบตัวยาสำคัญมากมาย ตัวอย่างเช่น ควินีน(quinine) และ ควินิดีน(quinidine) จากเปลือกชิงโคนา โคนิอิน (coniin) ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์จากน้ำมันเอมล็อค (Hemlock) แอโทรปีน(atropine) จากเดดลี ไนท์เชด(Deadly Nightshade) (เอมอร โสมนะนันธุ์ และ นันทวัน บุณยะประภัศร 2523 : 104-150) ต่อมากรรมวิธีในการแยกสารให้บริสุทธิ์ได้รับการพัฒนามากขึ้น ประกอบกับความก้าวหน้าในการใช้เครื่องมือหาสูตรโครงสร้างของสาร ทำให้การแยกสารและการหาเอกลักษณ์ (identify) ของสารต่างๆ จากพืชทำได้รวดเร็วและถูกต้องยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีการค้นพบสารสำคัญต่างๆ จากสมุนไพรและพืชอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมาก

ในประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรรักษาโรคมานาน โดยนำส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ลำต้น กิ่ง ก้าน ดอก ใบ ราก และเปลือกมาใช้รักษาโรคโดยตรง หรือนำมาใช้ประกอบเป็นเครื่องยา การวิจัยทางเคมีของสมุนไพรไทย เริ่มเมื่อปี พ.ศ.2484 โดยศาสตราจารย์ ดร.แถบ นีละนิธิ ได้ศึกษาสารสำคัญของโมกหลวง มะเกลือ มะแว้ง ฯลฯ ซึ่งนับได้ว่าเป็นก้าวแรกของการศึกษาวิจัยทางเคมีของสมุนไพรไทย (เทพ เชียงทอง 2520:47-52) หลังจากมีการศึกษาสารประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสมุนไพรได้เป็นจำนวนมาก การใช้ยารักษาโรคจึงเปลี่ยนจากการใช้

ส่วนต่างๆ ของสมุนไพรมาเป็นการใช้สารสำคัญแทน การใช้ยาในรูปของสารบริสุทธิ์นี้ทำให้สามารถปรับขนาดที่ใช้ได้ง่าย และให้ผลการรักษาแน่นอนกว่าการใช้สมุนไพรโดยตรง ทั้งยังสามารถกำจัดอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากสารอื่นที่มีในสมุนไพรได้ นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์สารที่แยกได้จากพืช สังเคราะห์อนุพันธ์ต่างๆ ของสารที่แยกจากพืช เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคที่ดีกว่าเดิม แต่ถึงแม้ว่าจะพบสารชนิดใหม่จากพืช และสังเคราะห์สารที่แยกได้จากพืชขึ้นมากมายก็ตาม ปัจจุบันพืชยังเป็นแหล่งสำคัญในการค้นพบตัวยาใหม่ๆ ดังเห็นได้จากการค้นคว้าหาตัวยาใหม่จากพืชยังคงศึกษากันอย่างกว้างขวาง ด้วยเหตุที่ประเทศไทยมีสมุนไพรอีกมากที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาวิจัย (นิทยา ตันติเวชวุฒิกุล 2523 : 99-103)

พุดน้อย(Ervatamia microphylla Kerr.) เป็นวัชพืชที่พบในป่า ชายป่า ไร่ สวน และที่รกร้างบางแห่ง ประชาชนในภาคตะวันออกนิยมนำรากพุดน้อยมาใช้เป็นยาแก้ไข้ แก้ร้อนใน ดับพิษร้อน แก้ลม จากการศึกษาพืชในสกุล Ervatamia พบอินโดลแอลคาลอยด์ (indole alkaloids) หลายชนิดที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง (Gunesekera, Cordell and Fransworth. 1980:1213-1218) แต่ไม่มีรายงานการวิจัยทางด้านเภสัชวิทยา และทางด้านเคมีของพุดน้อย ผู้วิจัยจึงนำส่วนรากของพุดน้อยมาศึกษาทางด้านเคมี เพื่อความก้าวหน้าทางด้านอินทรีย์เคมี และเป็นข้อมูลที่จะนำไปสู่การศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาต่อไป

<u>ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. เพื่อสกัดสารองค์ประกอบบางชนิดจากรากพุดน้อย โดยใช้คลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลาย
2. ทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์บางชนิด
3. เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการแยกสารจากรากพุดน้อย และ วิธีการทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์
4. เพื่อวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

<u>ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. การสกัด การแยกสาร การทำสารที่แยกได้จากรากพุดน้อยให้บริสุทธิ์ จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่การค้นคว้าวิจัยทางด้านเภสัชวิทยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการสาธารณสุขต่อไป
2. ความรู้ ทักษะ และประสบการณ์ในการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัด การแยกสาร การทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ จากพืชชนิดอื่นได้กว้างขวางยิ่งขึ้น

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การวิจัยครั้งนี้ทำการสกัดสารเฉพาะส่วนรากแห้งของต้นพุดน้อย ที่นำมาจาก ตำบลคลองใหญ่ อำเภอแหลมงอบ จังหวัดตราด โดยใช้คลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ เป็นตัวทำละลาย

2. ทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ 5 ประเภท คือแอลคาลอยด์ (alkaloid) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์(cardiac glycoside) ซาโปนิน(saponin) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ คูมาริน(coumarin)

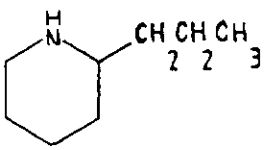
3. แยกสารที่สกัดได้จากรากพุดน้อย และทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี(chromatography technique) และการตกผลึก

4. วิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy technique)

นิยามศัพท์เฉพาะ

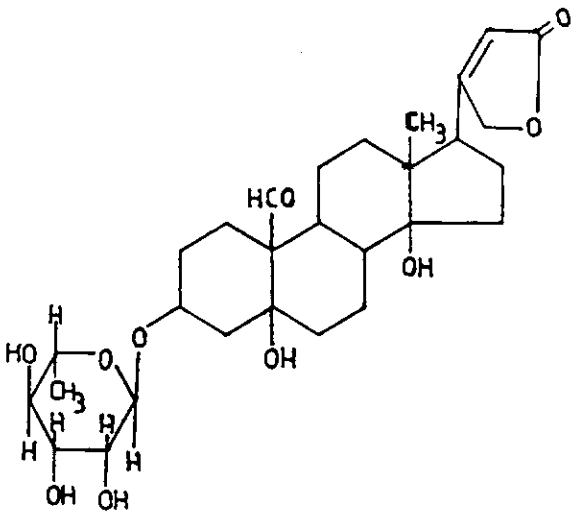
1. สมุนไพร หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ(natural products) ที่มีสมบัติในทางยา ไม่ว่าจะมาจากสิ่งใดในธรรมชาติ ตั้งแต่พืชชั้นต่ำสุดจนถึงพืชชั้นสูงสุด ตั้งแต่สัตว์ชั้นต่ำสุดจนถึงสัตว์ชั้นสูงสุด รวมถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำพวกโพรทีสทา(protista) ซึ่งอยู่ระหว่างพืชและสัตว์ เช่น เชื้อรา และ แบคทีเรีย เป็นต้น และรวมถึงวัตถุธาตุต่างๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติด้วย

2. แอลคาลอยด์ เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก(heterocyclic compound) ที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุล มีสมบัติเป็นเบส มีรสขม ตัวอย่างแอลคาลอยด์ เช่น โคนิอิน(coniin)



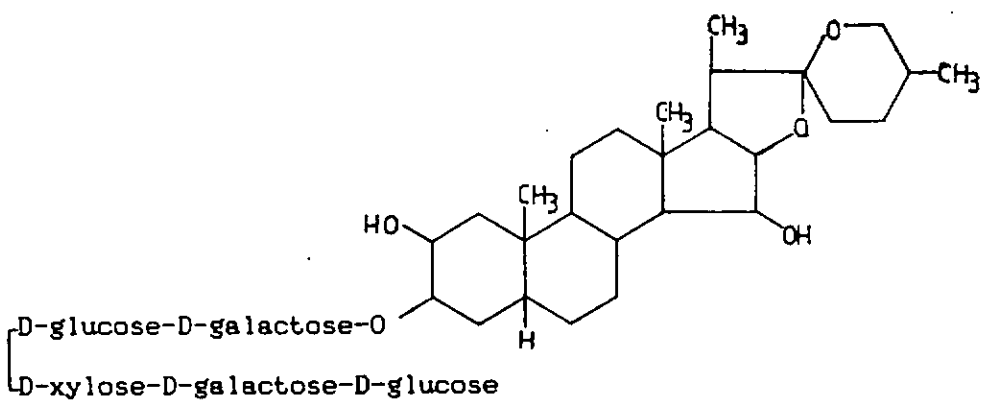
โคนิอิน

3. คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เป็นสารที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาล เชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลหรือที่เรียกว่าเจนิน(genin) สารประกอบพวกนี้มีเจนินเป็นสเตอรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus) จับกับวงแลคโทนที่ไม่อิ่มตัว(unsaturated lactone ring) ตัวอย่างคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เช่น คอนวาลลาทอกซิน(convallatoxin)



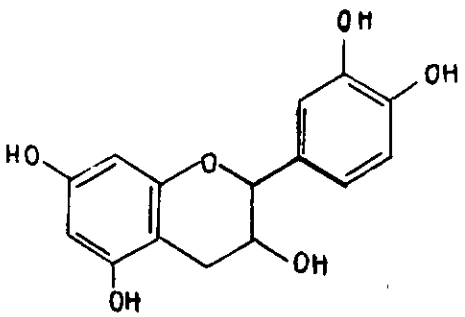
คอนวาลลาทอกซิน

4. ซาโปนิน เป็นไกลโคไซด์ชนิดหนึ่ง เมื่อนำซาโปนินมาไฮโดรไลซ์จะได้ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลหรือที่เรียกว่า ซาโปเจนิน(sapogenin) กับส่วนที่เป็นน้ำตาล ซาโปเจนินไม่ละลายน้ำ มี 2 ประเภท คือ สเตอรอยด์ลซาโปเจนิน (steroidal sapogenin) และไตรเทอร์ปีนอยด์ล ซาโปเจนิน (triterpenoidal sapogenin) ตัวอย่างซาโปนิน เช่น ดิจิโทนิน(digitonin)



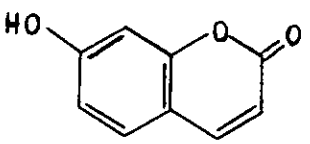
ดิจิโทนิน

5. ฟลาโวนอยด์ เป็นไกลโคไซด์ที่พบในพืชทั่ว ๆ ไป ส่วนของพืชที่พบสารนี้มักเป็นส่วนที่มีสี เช่น ดอก ผล ใบ อาจพบได้บ้างในส่วนของเปลือกราก และแก่น ส่วนที่เป็นเจนินมีสูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็น C_6-C_3-C_6 ตัวอย่างฟลาโวนอยด์ เช่น คาเทชิน(catechin)



คาเทชิน

6. คูมาริน หรือ 1,2-เบนโซไพโรน(1,2-benzopyrone) และอนุพันธ์ของคูมารินเป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่พบในรูปอิสระไม่เป็นไกลโคไซด์ ตัวอย่างสารจำพวกคูมาริน เช่น อัมเบลลิเฟอโรน(umbelliferone)



อัมเบลลิเฟอโรน

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

พุดน้อย มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า Ervatamia microphylla Kerr. ชื่ออื่นที่ใช้เรียกกันตามความแตกต่างของท้องถิ่น คือ พริกป่าเล็ก พริกป่า อยู่ในวงศ์บานบุรี(Apocynaceae) (เสนาะ บุญมี 2523:129-130) เป็นไม้พุ่ม ลำต้นเกลี้ยง มีน้ำยางสีขาว ใบออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบรูปขนานแคบๆ ปลายใบยื่นเป็นหางยาว ปลายสุดมน เนื้อใบกระด้าง ดอกสีขาวออกเป็นช่อ ช่อละ 3-4 ดอก มีก้านช่อและก้านดอก กลีบรองดอก 5 กลีบรูปไข่ปลายแหลม โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอดหรือท่อสั้นๆ รูประฆัง กลีบดอก 5 กลีบรูปขอบขนานปลายมน โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอดทรงกระบอกยาว ผลออกคู่กัน 2 ผัก โคนผักลีบเล็กคล้ายก้าน ปลายผักเป็นจงอยยาว เปลือกเกลี้ยง สีน้ำตาล เมื่อแก่จัดผักจะแตกออกเป็น 2 ซีกมี 1-4 เมล็ด พบตามป่า ชายป่า และที่รกร้างบางแห่ง ประโยชน์ทางยาของรากพุดน้อย นิยมใช้เป็นยาแก้ลม แก้ร้อนใน ดับพิษร้อน และรักษาอาการไข้ (สีนา ผู้พัฒนพงศ์ 2522:116)

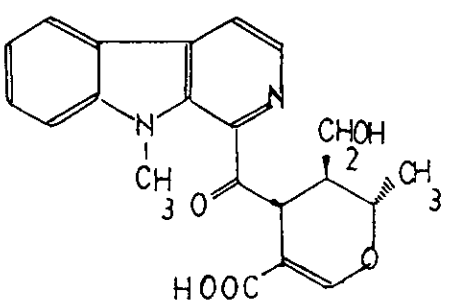
การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชในวงศ์บานบุรี(Apocynaceae)

Allamanda blanchetti A.DC. จากการแยกสารและทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ จากส่วนเปลือกรากของ Allamanda blanchetti A.DC. พบสารจำพวกคูมาริน โดยนำส่วนสกัดของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึก ได้ผลึกสีเหลืองสดของ 5,6-ไดเมทอกซี-7-ไฮดรอกซี-คูมาริน(5,6-dimethoxy-7-hydroxycoumarin) มีชื่อสามัญว่า อัมคาลิน(umckalin) สูตรโมเลกุลคือ $C_{11}H_{10}O_5$ จุดหลอมเหลว 149-150 องศาเซลเซียส นับว่าเป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการแยกอัมคาลินได้จากแหล่งอื่นที่ไม่ใช่พืชในสกุล Pelargonium (Bhattacharyya and Morais. 1986 : 354-371)

Alstonia angustiloba และ Alstonia pneumatophora จากการสกัดแยกแอลคาลอยด์จากใบและเปลือกลำต้นของ Alstonia angustiloba และจากใบ เปลือกลำต้น และเปลือกรากของ Alstonia pneumatophora นำส่วนสกัดมาแยกแอลคาลอยด์โดยคอลัมน์-โครมาโทกราฟี และโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ได้แอลคาลอยด์ที่เคยพบแล้ว คือ วาลเลซามีน (vallesamine) และออร์โท-แอซิทิลวาลเลซามีน(o-acetylvallesamine) และพบแอลคาลอยด์ชนิดใหม่ คือ แองกูสทิโลบีน เอ (angustilobine A) 15-ไฮดรอกซี-

แองกุสทิโลบีน เอ(15-hydroxy-angustilobine A) แองกุสทิโลบีน บี(angustilobine B) 4,6-เซโคแองกุสทิโลบีนาล เอ(4,6-secoangustilobinal A) 6,7-เซโค-19,20-อีพอกซีแองกุสทิโลบีน บี(6,7-seco-19,20-epoxyangustilobine B) 6,7-เซโค-6-ไซยาโนสเตมมาดีนีน(6,7-seco-6-cyanostemmadenine) 6,7-เซโคแองกุสทิโลบีน บี (6,7-secoangustilobine B) และ นอร์-6,7-เซโคแองกุสทิโลบีน เอ(nor-6,7-seco-angustilobine A) (Zeches and others. 1987:714-720)

Alstonia constricta จากการแยกสารสำคัญและทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ จากส่วนเปลือกลำต้นของ Alstonia constricta ได้แอลคาลอยด์ 8 ชนิด บางชนิดเป็นแอลคาลอยด์ที่เคยแยกได้จากเปลือกรากของพืชชนิดนี้ เช่น อัลสโทนิลิดีน(alstonilidine) อัลสโทนิดีน (alstonidine) โอ-3,4,5-ไตรเมทอกซีเบนโซอิล-ควีบราชิดีน(O-3,4,5-trimethoxy-benzoyl-quebrachidine) แต่บางชนิดเป็นแอลคาลอยด์ที่ไม่เคยพบในพืชชนิดนี้มาก่อน เช่น วินคามิดีน(vincamedine) 1-คาร์โบเมทอกซีคาร์โบลีน (1-carbomethoxycarboline) ควีบราชิดีน(quebrachidine) และที่สำคัญ คือ พบแอลคาลอยด์ชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า 14-คีโตอัลสโทนิดีน(14-ketoalstonidine) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 1 (Allam and others. 1987 : 623-625)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ 14-คีโตอัลสโทนิดีน

Catharanthus roseus G.D. หรือแพงพวยฝรั่ง เป็นสมุนไพรที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากมีวินบลาสทีน(vinblastine) (Neuss and others. 1959:4754-4755) และวินคริสทีน(vincristine) (Svoboda. 1961:173-178) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งบางชนิด วินบลาสทีนซัลเฟต ใช้รักษาโรคต่อมน้ำเหลืองอักเสบเรื้อรัง(Hodgkin's disease) มะเร็งในต่อมน้ำเหลือง(choriocarcinoma) เนื้องอกในระบบประสาท(Neuroblastoma) เนื้องอกในเต้านม ปอด และ มะเร็งในเม็ดเลือดทั้งชนิดเรื้อรังและเฉียบพลัน วินคริสทีนซัลเฟต ใช้รักษามะเร็งเม็ดเลือดในเด็ก มะเร็งในต่อมน้ำเหลือง วิลม์ส ทูเมอร์ (Wilm's tumour)

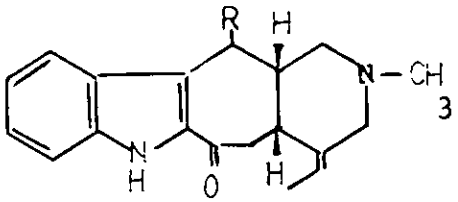
มะเร็งในระบบประสาทและเนื้องอกชนิดซาร์โคมา(sarcoma) วินเดซีน(vindasine) เป็นแอลคาลอยด์ที่สกัดได้จากเมล็ดและใบ มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท แอลคาลอยด์ที่มีความสำคัญทางยาอีกชนิดหนึ่ง คือ แอจมาลิซีน(ajmalicine) มีฤทธิ์ทำให้หลอดโลหิตผ่อนคลาย และใช้เป็นยาลดความดันโลหิต แต่มีในธรรมชาติน้อยส่วนใหญ่ได้จากวิธีกึ่งสังเคราะห์จากเสอร์เพนทีน (serpentine) นอกจากแอลคาลอยด์ดังกล่าวแล้วยังพบแอลคาลอยด์ แคทาแรนทีน (catharanthine) โลชเนริซีน (lochnericine) วินโดลินีน(vindolinine) วินโดลีน (vindoline) (Gorman and others. 1957 : 256-257) ลูโรซีน(leurosine) ไวโรซีน (virosine) และเพอริวีน(perivine) (Svoboda. 1958:834) เป็นต้น ปริมาณแอลคาลอยด์ทั้งหมดในใบแพงพวยฝรั่ง มีประมาณร้อยละ 0.7-0.82 ปัจจุบันผลในการสกัดแยกแอลคาลอยด์ยังต่ำอยู่ กล่าวคือใบ 1 ตัน จะได้ วินคริสทีน 50 มิลลิกรัม และ วินบลาสทีน 2 กรัม

Ervatamia hainanensis จากการสกัดสารสำคัญจากส่วนรากของ Ervatamia hainanensis ได้แอลคาลอยด์ร้อยละ 0.3 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้ไดเมอริคแอลคาลอยด์ แล้วนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้โมโนเมอริคอินโดลแอลคาลอยด์ (monomeric indole alkaloid) 11 ชนิด เป็นแอลคาลอยด์ที่เคยพบแล้ว 9 ชนิด ได้แก่ โคโรนาริดีน (coronaridine) โคโรนาริดีนไฮดรอกซีอินโดลนีน (coronaridine hydroxyindolenine) เฮนีนีน(heyneanine) โวบาซีน(vobasine) เพอริวีน(perivine) อิโบกามีน (ibogamine) จีสโซชิซอล (geissoschizol) 10-ไฮดรอกซีจีสโซชิซอล (10-hydroxygeissoschizol) และ 3-ออกโซโคโรนาริดีน (3-oxocoronaridine) และพบแอลคาลอยด์ใหม่ 2 ชนิด คือ 10-ไฮดรอกซีเฮนีนีน(10-hydroxyheyneanine) และ 3-เบต้า-ไฮดรอกซีเอทิลโคโรนาริดีน (3-(β-hydroxyethyl)-coronaridine) (Feng and others. 1982 : 212-214)

Ervatamia heyneana จากการสกัดอินโดลแอลคาลอยด์ จากลำต้น และเปลือกลำต้น โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ และเมทานอล เป็นตัวทำละลาย สกัดแอลคาลอยด์จากส่วนสกัดเมทานอลนำแอลคาลอยด์ที่ได้มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้อินโดลแอลคาลอยด์ 14 ชนิด และไตรเทอร์พีนอยด์(triterpenoids) 3 ชนิด นำสารที่แยกได้มาศึกษาต่อพบว่ามีอินโดลแอลคาลอยด์ 6 ชนิด ที่มีผลต่อต้านเซลล์มะเร็ง ได้แก่แคมป์โทเทซิน(camptothecin) 9-เมทอกซีแคมป์โทเทซิน (9-methoxycamptothecin) โคโรนาริดีน(coronaridine) เพอริคอลลีน(pericalline) เฮนีทีน(heyneatine) และ 10-เมทอกซีอีแกลนดีน-เอ็น-ออกไซด์(10-methoxyeglandine-N-oxide) (Gunesekera, Cordell and Fransworth. 1980:1213-1218)

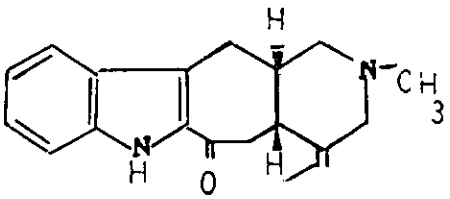
Pterotaberna inconspicua จากการนำใบมาแยกแอลคาลอยด์ พบว่าแอลคาลอยด์ที่แยกได้และมีปริมาณมาก คือ เมทูนีน (methuenine) แยกได้ร้อยละ 0.304 และ

16-อีพิเมทูนีน (16-epimethuenine) แยกได้ร้อยละ 0.160 ส่วนแอลคาลอยด์ที่มีปริมาณน้อย คือ เมทูนีน-เอ็น-ออกไซด์ (methuenine-N-oxide) แยกได้ร้อยละ 0.022 และ 6-ออกโซเมทูนีน (6-oxomehtuenine) แยกได้ร้อยละ 0.020 โครงสร้างของสารต่างๆ ที่แยกได้ แสดงในภาพประกอบ 2 (Bakana and others. 1985:766-771)

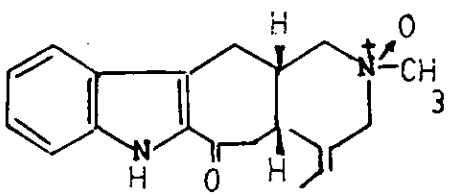


methuenine R = H,H

6-oxomethuenine R = O



16-epimethuenine



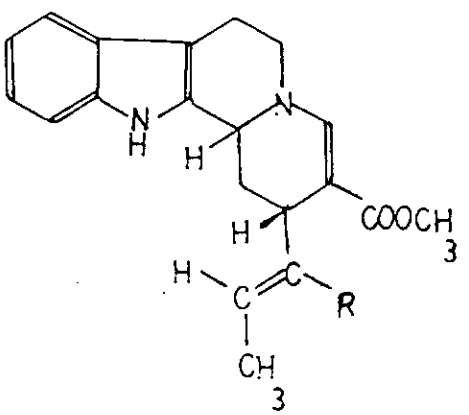
methuenine-N-oxide

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบของ Pterotaberna inconspicua

Rauwolfia cambodiana Pierre. หรือระย่อมหลวง จากการสกัดแยกแอลคาลอยด์จากส่วนรากพบอินโดลแอลคาลอยด์ คือ แอจมาลีน(ajmaline) แอริซีน(aricine) ไอโซรีเสอร์พิลีน(isoreserpiline) เพลิริน(pelirine) และ รีเสอร์พีน (reserpine) (Warank Boonchuay and Court. 1976:201-207) แอลคาลอยด์ที่นับว่ามีความสำคัญทางยา คือ แอจมาลีนใช้เป็นยาป้องกัน หรือ ลดการเต้นไม่เป็นจังหวะของหัวใจ รีเสอร์พีนใช้เป็นยาลดความดันโลหิต และยาระงับประสาท (Natori, Ikekawa and Suzuki. 1981:341)

Rhazya stricta จากการสกัดสารจากใบด้วยเมทานอล นำส่วนสกัดมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ พบอินโดลแอลคาลอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ วาลเลเซีย-โคทามีน(vallasiachotamine) พอลีนิวริดีน(polyneuridine) เสวาริน(sewarine) และการสกัดสารจากรากด้วยเมทานอล นำส่วนสกัดมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วทำให้

บริสุทธิ์ พบอินโดลแอลคาลอยด์ คือ เตตระไฮโดรเสคามีน(tetrahydrosecamine) จากการนำอินโดลแอลคาลอยด์ ที่แยกได้มาทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า วาลเลเซียโคทามีน เสวารีน และเตตระไฮโดรเสคามีน มีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังได้มีการเตรียมอนุพันธ์ของเตตระไฮโดรเสคามีนอีก 3 ชนิด คือ เตตระไฮโดรเสคามีนไดออล์ เตตระไฮโดรเสคามีนแอซีเตต และไดดีเมทอกซีคาร์โบนิลเตตระไฮโดรเสคามีน พบว่า เตตระไฮโดรเสคามีนไดออล์ มีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งสูงมาก (Mukhopadhyay and others. 1981:696-700) ต่อมาได้สกัดแอลคาลอยด์จากผัก(นำเมล็ดออกแล้ว)ด้วยแอลกอฮอล์ นำส่วนสกัดมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง พบสารสำคัญ คือ ไอโซวาลเลเซียโคทามีน(isovallesiachotamine)(1) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 3 มีลักษณะเป็นผลึกที่สลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกอากาศและแสงสว่างมีจุดหลอมเหลว 244 องศาเซลเซียส เมื่อนำมารีดิวส์ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์($NaBH_4$) จะได้แอลกอฮอล์(2) (Rahman and Malik. 1984: 388-389)

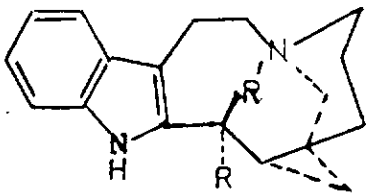


(1) R = CHO

(2) R = CH_2OH

ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของไอโซวาลเลเซียโคตามีน

นอกจากนี้ ยังสามารถแยก วินคาดีน(vincadine) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 4 สารนี้ตกผลึกในเมทานอล มีจุดหลอมเหลว 125 องศาเซลเซียส ค่าการหมุนจำเพาะ(specific rotation)± 0 ($[\alpha]_D^{23} \pm 0$) (Rahman and Malik. 1985:153-154)



R = H

R' = $COOCH_3$

ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของวินคาดีน

Thevetia peruviana Schum. หรือยี่โถฝรั่ง สารสำคัญที่สกัดได้ส่วนมากเป็นไกลโคไซด์ชนิด คาร์ดิโนไลด์(cardenolide) ในการสกัดสารจากเมล็ดด้วยเอทานอล นำส่วนสกัดมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางพบเซอร์เบริน(cerberin) และ เทวิทิน(thevetin) (Tewari, Harpolani and Bhatt. 1971:50) ราก และเปลือกลำต้น พบเซอร์เบโรไซด์(cerberoside) เนริอิโฟลิน(neriifolin) เพอรูโวไซด์(peruvoside) รูโวไซด์(ruvoside) เทวิทิน เอ (thevetin A) เทวิทิน บี(thevetin B) และพบพอลิพรีนอยด์(polyprenoid) ที่สำคัญ คือ เทวิโฟลิน(thevefolin) (Datta. 1977:109-124)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสาร
(Phytochemical screening test)

1.1 รีเอเจนต์

รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบแอลคาลอยด์

1. สารละลายเมเยอร์ (Mayer's reagent)
2. สารละลายวอลเสอร์ (Valser's reagent)
3. สารละลายแวกเนอร์ (Wangner's reagent)
4. สารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent)
5. สารละลายเคร้าท์ (Kraut's reagent)
6. สารละลายมาร์ม (Marme's reagent)

รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

1. สารละลายเคดด์ (Kedd's reagent)
2. สารละลายเคลเลอร์-คีไลนี (Keller-Kiliani's reagent)

หมายเหตุ วิธีการเตรียมรีเอเจนต์ แสดงในภาคผนวก

1.2 วิธีดำเนินการทดสอบเบื้องต้น

นำรากพุดน้อยตากแห้งบดละเอียด 100 กรัม ใส่ในขวดสีชา เติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จนท่วมรากพุดน้อย ตั้งทิ้งไว้ 7 วัน โดยในแต่ละวันให้คนรากพุดน้อยทุกวัน หลังจากครบ 7 วันแล้ว กรองสารละลายที่สกัดได้ นำมาทำให้เข้มข้นโดยระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน เรียกสารที่สกัดได้นี้ว่า ผลสกัดด้วยเอทานอล(ethanolic extract) แล้วทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ 5 ประเภท คือ แอลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน โดยทดสอบตามลำดับดังนี้ (Farnsworth. 1966:245-265)

1.2.1 การทดสอบแอลคาลอยด์

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์ อาศัยปฏิกิริยาของแอลคาลอยด์กับรีเอเจนต์ที่ให้ตะกอนชัดเจน ได้แก่ สารละลายเมเยอร์ สารละลายวอลเสอร์ และสารละลายมาร์มให้ตะกอนสีขาว สารละลายดราเจนดอร์ฟให้ตะกอนสีส้ม สารละลายแวกเนอร์ และ สารละลายเคร้าท์ให้ ตะกอนสีน้ำตาล

ขั้นตอนการทดสอบ

ขั้นที่ 1 การทดสอบแอลคาลอยด์เบื้องต้น

(Preliminary alkaloid test)

นำผลสกัดด้วยเอทานอล 1 กรัม มาเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มและคนเป็นเวลา 10 นาที กรอง รินสารละลายลงในหลอดทดลอง 6 หลอด ๆ ละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (สารละลายที่เหลือเก็บไว้ทดสอบในขั้นที่ 2) นำไปทดสอบกับรีเอเจนต์ต่อไปนี้ คือ สารละลายเมเยอร์ สารละลายวอลเลอร์ สารละลายแวกเนอร์ สารละลายดราเจนดอร์ฟ สารละลายเคร้าท์ และสารละลายมาร์ม สังเกตสีและปริมาณตะกอน

ขั้นที่ 2 การทดสอบแอลคาลอยด์เพื่อยืนยันผล

(Confirmed alkaloid test)

นำสารละลายที่เหลือจากขั้นที่ 1 มาทำให้เป็นเบส ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 28 รินสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมชั้นของคลอโรฟอร์ม เขย่ากับโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรอง ระเหย คลอโรฟอร์มออกจนเกือบแห้ง เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มและคนเป็นเวลา 10 นาที กรอง รินสารละลายลงในหลอดทดลอง 6 หลอด ๆ ละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อทดสอบกับรีเอเจนต์ 6 ชนิด เช่นเดียวกับขั้นที่ 1 ส่วนชั้นน้ำเก็บไว้ทดสอบในขั้นที่ 3

ขั้นที่ 3 การทดสอบควอเทอร์นารี(quaternary) และ/หรือ เอมีนออกไซด์เบส(amine oxide base)

นำสารละลายที่เป็นชั้นน้ำจากขั้นที่ 2 มาทำให้เป็นกรดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แบ่งสารละลายเป็น 6 หลอด เพื่อทดสอบกับรีเอเจนต์ 6 ชนิด เช่นเดียวกับขั้นที่ 1 และ 2

1.2.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในนิช โดยวิธีทางเคมีที่ได้ผลค่อนข้างแน่นอน ควรใช้รีเอเจนต์ หรือปฏิกิริยาที่มีผลต่อองค์ประกอบที่สำคัญทั้ง 3 ส่วน ของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ

ก. สารละลายเคดด์ ทดสอบส่วนที่ไม่อิ่มตัวของแลคโทนที่ตำแหน่งแอลฟาและเบต้า (α,β-unsaturated lactone)

ข. ปฏิกิริยาเคลเลอร์-คีไลนี ทดสอบน้ำตาลดีออกซี (deoxy sugar)

ค. ปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Berchard reaction) ทดสอบสเตอรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus)

การทดสอบต้องได้ผลบวกทั้ง 3 ปฏิกิริยา จึงจะถือว่ามีคาร์ดิแอก-ไกลโคไซด์

ขั้นตอนการทดสอบ

นำผลสกัดด้วยเอทานอล 1 กรัม มาเติมสารละลายเลดแอซีเตตเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้เดือดเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น กรอง สกัดสารที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้งๆละ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมชั้นคลอโรฟอร์มเขย่ากับโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรอง แบ่งสารละลายที่กรองได้ออกเป็น 3 ส่วน

ก. ทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์นิวเคลียส โดยใช้ปฏิกิริยา-ลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ดดังนี้ นำสารละลายส่วนที่ 1มาระเหยจนเกือบแห้ง ทำให้เย็น หยดแอซิติก-แอนไฮไดรด์ 3 หยด เขย่าแล้ว ค่อยๆ หยดกรดซัลฟิวริคเข้มข้นลงไปตามข้างหลอด 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงทันที และภายใน 1ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ม่วง น้ำเงิน และเขียวตามลำดับ

ข. ทดสอบส่วนที่ไม่อิ่มตัวของแลคโทนที่ตำแหน่งแอลฟาและเบต้า โดยใช้สารละลายเคดด์ดังนี้ ระเหยคลอโรฟอร์มในส่วนที่ 2 จนเกือบแห้ง เติมสารละลายเคดด์ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 2-3 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงิน หรือม่วงชมพู

ค. ทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซี โดยใช้ปฏิกิริยาเคลเลอร์-คีไลนี ดังนี้ นำสารละลายส่วนที่ 3 มาระเหยจนเกือบแห้ง เติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นไปตามข้างหลอดจะเกิดวงแหวน สีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นและสารละลายชั้นบนมีสีเขียวอ่อน

1.2.3 การทดสอบซาโปนิน

วิธีทดสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจหา ซาโปนิน มีหลายวิธีในที่นี้จะใช้ 2 วิธี คือ การทดสอบฟอง และการทดสอบสี ในการทดสอบฟองหลังเขย่าจะได้ฟองแบบรังผึ้ง ซึ่งจะคงทนอยู่นานอย่างน้อย 30 นาที เมื่อเติมกรดแล้วเขย่าฟองจะหายไปเกิดตะกอนขึ้นแทน ส่วนการทดสอบสีใช้ปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด จะให้สีต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของซาโปนิน

ขั้นตอนการทดสอบ

ก. การทดสอบฟอง ชั่งรากพุดน้อยแห้งที่บดละเอียด 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วต้มบนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที กรองขณะร้อน ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าสารละลายที่ได้อย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที สังเกตผลนาน 30 นาที เติมสารละลายกรดซัลฟิวริคเจือจาง จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มประมาณ 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที บันทึกผล

ข. การทดสอบลี ใช้ปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด โดยนำผลสกัดด้วยเอทานอล 2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริคเจือจาง จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่า ต้มประมาณ 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 15 ลูกบาศก์-เซนติเมตร นำชั้นคลอโรฟอร์มมาเติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรอง และระเหยจนเกือบแห้ง แล้วทดสอบด้วยลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ดรีเอเจนต์ ทำนองเดียวกับการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยทั่วไปถ้ามีสเตอรอยดัลซาโปเจนินจะให้สีน้ำเงิน หรือเขียวแกมน้ำเงิน แต่ถ้ามีไตรเทอร์พีนอยดัล-ซาโปเจนินจะให้สีชมพูอมส้ม หรือม่วงแดง

1.2.4 การทดสอบฟลาโวนอยด์

การทดสอบเบื้องต้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน(cyanidin) เพื่อตรวจสอบส่วนที่เป็น แกมมา-เบนโซไพโรน นิวเคลียส(r-benzo-pyrone nucleus) นอกจากนี้ยังใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ ลิวโคแอนโทไซยานิน(leucoantho-cyanine)

ขั้นตอนการทดสอบ

นำผลสกัดด้วยเอทานอล 1 กรัม สกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์หลายๆ ครั้งจนปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ใช้สกัดไม่มีสี แล้วนำของแข็งที่ปราศจากไขมันมาละลายในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร กรอง แบ่งสารละลายที่กรองได้ออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ หลอดที่ 2 และ 3 นำมาทดสอบดังต่อไปนี้

ก. การทดสอบไซยานิดิน (Cyanidin test) นำสารละลายหลอดที่ 2 มาเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่โลหะแมกนีเซียม 3-4 ชิ้น สังเกตการเปลี่ยนสีเทียบกับสารละลายในหลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น จำนวน 2 ลูกบาศก์เซนติเมตรและออกทานอล จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่า และทิ้งไว้ให้แยกชั้น สังเกตสีในชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ ถ้าเป็นแอไกลโคนจะให้สีในชั้นออกทานอล ซึ่งอยู่ชั้นบน แต่ถ้าเป็นไกลโคไซด์จะให้สีในชั้นน้ำ ซึ่งอยู่ชั้นล่าง

ข. <u>การทดสอบลิวโคแอนโทไซยานิน</u> (Leucoanthocyanine test) นำสารละลายหลอดที่ 3 มาเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 0.5 ลูกบาศก์-เซนติเมตร อุ่นบนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที สังเกตสี ถ้ามีฟลาโวนอยด์จะ ให้สีม่วงแดง

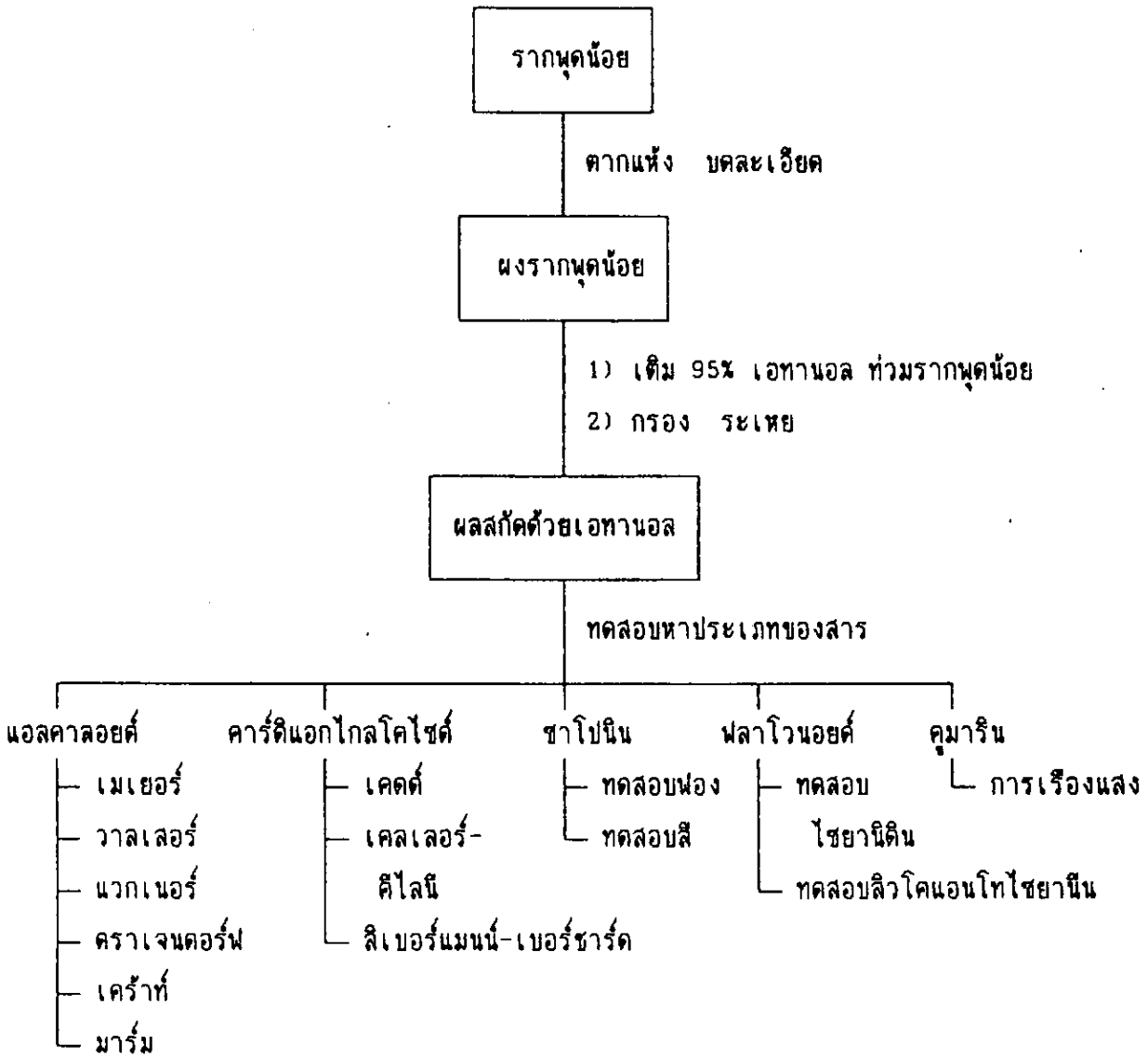
1.2.5 <u>การทดสอบคูมาริน</u>

สารจำพวกคูมารินเมื่อละลายในเบส วงไพโรน (pyrone ring) จะแตกได้เกลือ หรือไอออนของกรดออร์โท-ไฮดรอกซีซินนามิก(o-hydroxycinnamic acid) ซึ่งเป็นรูปซิส (cis-form) เป็นสารที่ไม่เรืองแสง แต่ถ้าได้รับรังสีอุลตราไวโอเลต จะเปลี่ยนเป็นรูปแทรนส์ (trans-form) ซึ่งจะเรืองแสงเป็นสีเหลืองเขียว ในเวลาไม่กี่นาที

<u>ขั้นตอนการทดสอบ</u>

นำรากพุดน้อยตากแห้งบดละเอียด 3 กรัม ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น คลุมปากขวด ด้วยกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แล้วปิดทับอีกชั้นด้วยแอลูมิเนียมแผ่นบาง อุ่นบนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 30 นาที นำกระดาษกรองที่ปิดปากขวด ไปฉายแสงอุลตราไวโอเลต สังเกตการเรืองแสง

ขั้นตอนการทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสาร



ภาพประกอบ 5 แผนภูมิแสดงการทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสาร

2. การสกัดสารออกจากรากพุดน้อย

2.1 การสกัดสารออกจากรากพุดน้อยด้วยเอทานอล

นำรากพุดน้อยตากแห้งบดละเอียด 10 กิโลกรัม สกัดด้วยเอทานอล โดยแช่ไว้ในเอทานอล 2 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมากรอง ทำให้เข้มข้นโดยระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้ผลสกัดด้วยเอทานอล กากที่เหลือหลังการสกัดนำมาแช่ในเอทานอลอีก ทำเช่นนี้ หลาย ๆ ครั้ง จนสารละลายเอทานอลที่ใช้สกัดไม่มีสี

2.2 การสกัดสารด้วยคลอโรฟอร์ม

แบ่งผลสกัดด้วยเอทานอลจากข้อ 2.1 ที่ระเหยแห้ง มาเติมน้ำ แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยใช้เครื่องสกัดของเหลว(liquid-liquid extractor) แยกชั้นคลอโรฟอร์มออกจากชั้นน้ำ ทำสารละลายแต่ละชั้นให้เข้มข้นโดยระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้ผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และผลสกัดด้วยน้ำ ตามลำดับ

3. การแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์

3.1 การแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล

3.1.1 แบ่งผลสกัดด้วยเอทานอลมาทำให้เป็นกรด ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 2 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

3.1.2 นำสารละลายกรดที่ได้มาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต จนสารละลายเอทิลแอซิเตตที่ใช้สกัดไม่มีสี แยกสารละลายชั้นกรดออกจากชั้นเอทิลแอซิเตต

3.1.3 นำสารละลายชั้นกรด มาทำให้เป็นเบส ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 28 นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จนสารละลายคลอโรฟอร์มที่ใช้สกัดไม่มีสี แยกชั้นคลอโรฟอร์ม ออกจากสารละลายชั้นเบส

3.1.4 กำจัดน้ำออกจากสารละลายคลอโรฟอร์ม ด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรอง ทำให้เข้มข้นโดยระเหยคลอโรฟอร์มออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน

3.1.5 นำสารที่สกัดได้จากเอทิลแอซิเตต ในข้อ 3.1.2 และสารที่สกัดได้จากคลอโรฟอร์ม ในข้อ 3.1.4 มาแยกหาองค์ประกอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และ/หรือ การตกผลึก

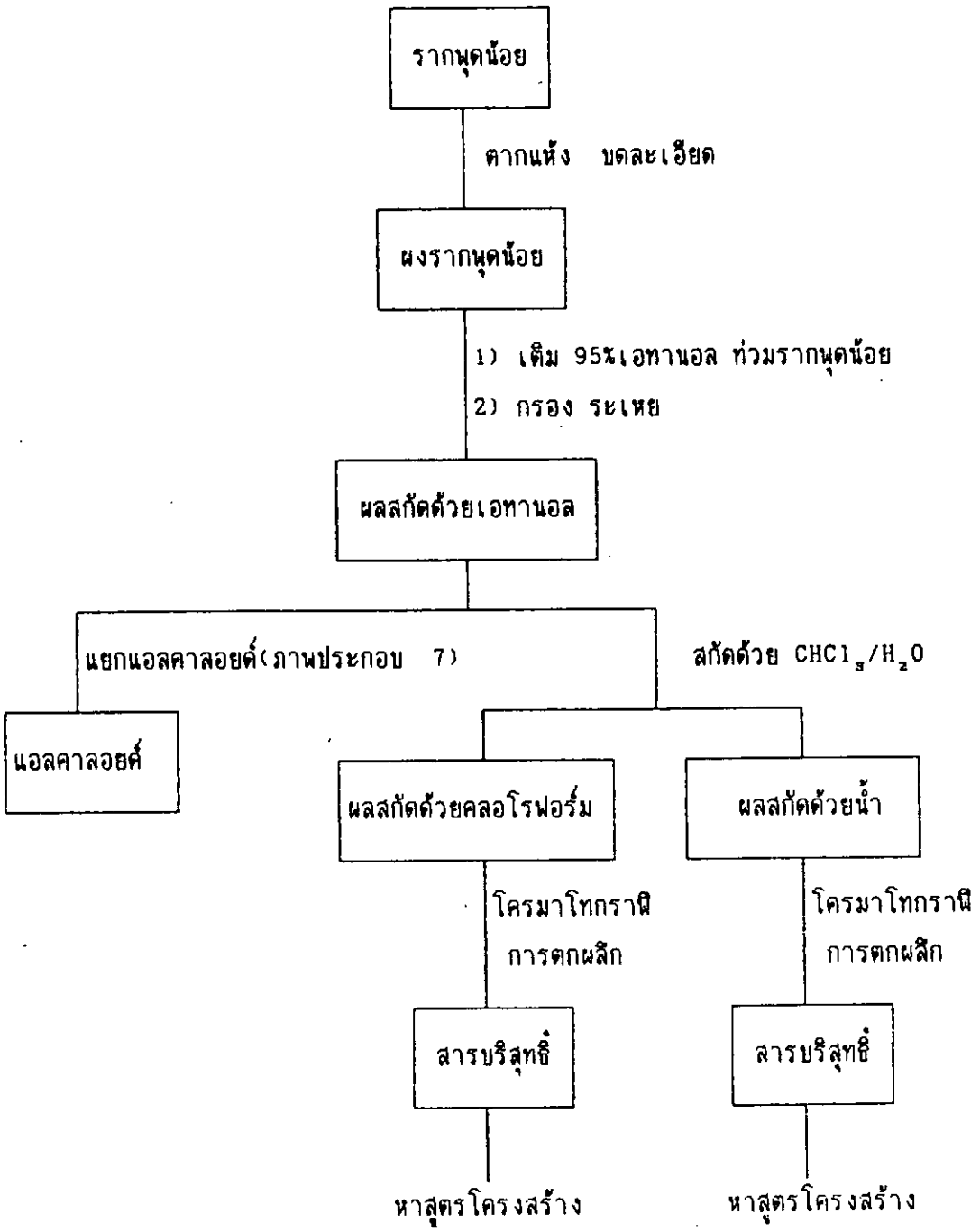
3.2 การแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และผลสกัดด้วยน้ำ

นำผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และผลสกัดด้วยน้ำ มาแยกหาองค์ประกอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และ/หรือ การตกผลึก

4. การวิเคราะห์สาร

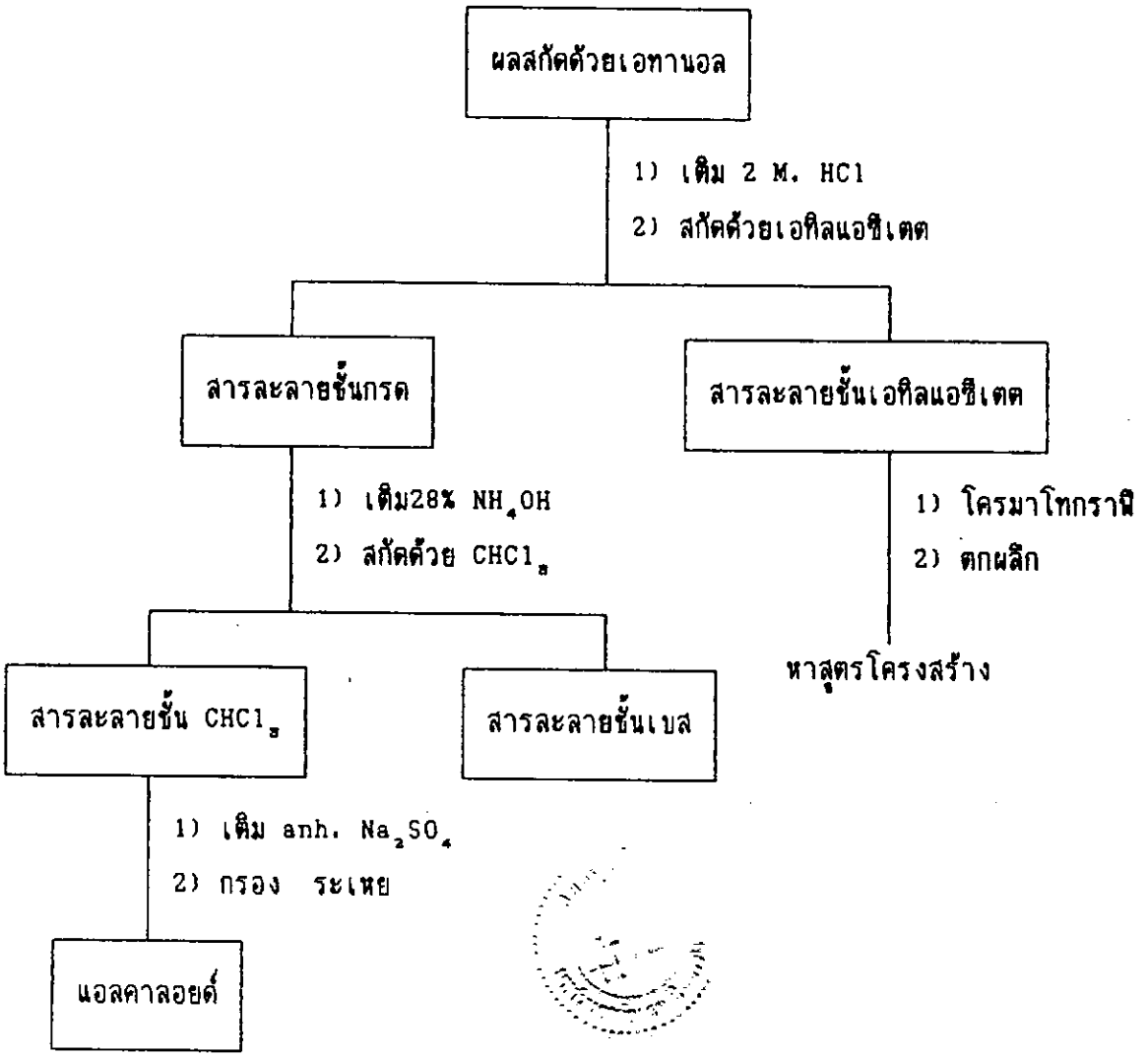
นำสารที่แยกได้ มาหาจุดหลอมเหลว การละลาย และตรวจหาสูตรโครงสร้างโดยใช้อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (infrared spectroscopy) โดยเครื่อง Perkin-Elmer 298 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy :NMR) โดยเครื่อง Varian XL-300 แมสสเปกโทรสโกปี (mass spectroscopy) โดยเครื่อง Finnigan 4021 และแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี (gas liquid chromatography) โดยเครื่อง Shimadzu GC-7 AG

ขั้นตอนการสกัด การแยก และการทำสารจากรากพุดน้อยใหบริสุทธิ์



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแสดงการสกัด การแยก และการทำสารจากรากพุดน้อยให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล



ภาพประกอบ 7 แผนภูมิแสดงการแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล

171168

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบเบื้องต้นทางเคมี เพื่อหาประเภทของสาร

1.1 ผลการทดสอบแอลคาลอยด์

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์ อาศัยปฏิกิริยาของแอลคาลอยด์กับรีเอเจนต์ที่ให้ตะกอนชัดเจน ได้แก่ สารละลายเมเยอร์ สารละลายวอลเสอร์ สารละลายแวกเนอร์ สารละลายดราเจนดอร์ฟ สารละลายเคร้าท์ และสารละลายมาร์ม ผลการทดสอบแอลคาลอยด์แสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์

รีเอเจนต์	การทดสอบแอลคาลอยด์เบื้องต้น	การทดสอบแอลคาลอยด์เพื่อยืนยันผล	การทดสอบควอเทอร์นารีและ/หรือเอมีนออกไซด์เบส
เมเยอร์	+++	++	+++
วอลเสอร์	+++	++	+++
แวกเนอร์	+++	++	+++
ดราเจนดอร์ฟ	+++	+++	+++
เคร้าท์	+++	++	+++
มาร์ม	+++	+	+++

หมายเหตุ +++ หมายถึง ตะกอนมาก

++ หมายถึง ตะกอนน้อย.

\+ หมายถึง สารละลายขุ่น

ผลการทดสอบ แสดงว่ามีแอลคาลอยด์ในผลสกัดด้วยเอทานอล เพราะให้ผลในทางบวกกับรีเอเจนต์ทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ

1.2 ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในพืชโดยวิธีทางเคมีที่ให้ผลค่อนข้างแน่นอน ควรใช้รีเอเจนต์หรือปฏิกิริยาที่มีผลต่อองค์ประกอบที่สำคัญทั้ง 3 ส่วนของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ ส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ วงแลคโทน และน้ำตาลดีออกซี ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์แสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ปฏิกิริยา	ผลการสังเกต
ก. ทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์	สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแดงและเขียวแกมน้ำเงินตามลำดับ
ข. ทดสอบส่วนที่เป็นวงแลคโทน	สารละลายสีเหลืองขุ่น
ค. ทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซี	เกิดวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียวอ่อน

ผลการทดสอบ แสดงว่าไม่มีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่มีส่วนที่เป็นสเตอรอยด์และน้ำตาลดีออกซีในผลสกัดด้วยเอทานอล

1.3 ผลการทดสอบซาโปนิน

การทดสอบซาโปนินใช้การทดสอบ 2 วิธี คือการทดสอบฟองและการทดสอบสี โดยใช้ปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด ผลการทดสอบซาโปนินแสดงไว้ในตาราง 3

ตาราง 3 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน

ปฏิกิริยา	ผลการสังเกต
การทดสอบฟอง	เกิดฟองเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้ฟองจะหายไป เมื่อเติมกรดแล้วเขย่า ไม่เกิดฟองและไม่เกิดตะกอน
ลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด	สารละลายเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแดง และเขียวแกมน้ำเงินตามลำดับ

ผลการทดสอบ จากการทดสอบฟองแสดงว่าไม่มีซาโปนินในผลสกัดด้วยเอทานอล แต่จากการทดสอบสีโดยใช้ปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด แสดงว่ามีส่วนที่เป็นสเตอรอยด์

1.4 ผลการทดสอบฟลาโวนอยด์

การทดสอบฟลาโวนอยด์ใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน และสิวโคแอนโท-ไซยานีนผลการทดสอบฟลาโวนอยด์แสดงไว้ในตาราง 4

ตาราง 4 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์

ปฏิกิริยา	ผลการสังเกต
ไซยานิดิน	ชั้นออกทานอลมีสีเหลืองเข้ม ชั้นน้ำมีสีเหลืองขุ่น
สิวโคแอนโทไซยานิน	ให้สารละลายสีน้ำตาลดำ

ผลการทดสอบ แสดงว่าไม่มีฟลาโวนอยด์ในผลสกัดด้วยเอทานอล

1.5 ผลการทดสอบคูมาริน

การทดสอบคูมาริน โดยการสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ให้ผลการทดสอบดังนี้

ผลการทดสอบ ไม่เกิดการเรืองแสงที่กระดาษกรอง แสดงว่าไม่มีคูมาริน ในผลสกัดด้วยเอทานอล

2. ผลการสกัดสารออกจากรากพุดน้อย

2.1 ผลการสกัดสารออกจากรากพุดน้อยด้วยเอทานอล

จากการนำรากพุดน้อยตากแห้งบดละเอียด 10 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเอทานอล ได้ผลสกัดด้วยเอทานอลเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำปนตะกอนเหลือง 801.3 กรัม

2.2 ผลการสกัดสารด้วยคลอโรฟอร์ม

แบ่งผลสกัดด้วยเอทานอลจากข้อ 2.1 300 กรัม มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มกับน้ำ โดยใช้เครื่องสกัดของเหลวได้ผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล 73.7 กรัม และผลสกัดด้วยน้ำเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ 195 กรัม

3. ผลการแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์

3.1 ผลการแยกแอลคาลอยด์จากผลสกัดด้วยเอทานอล

จากการแบ่งผลสกัดด้วยเอทานอลจากข้อ 2.1 264 กรัมมาแยกแอลคาลอยด์ ได้ผลสกัดสองส่วน คือผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง 41.8 กรัม เป็นผลสกัดที่แยกสารประเภทแอลคาลอยด์ออกไปและผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ 11.5 กรัม เป็นผลสกัดที่มีสารประเภทแอลคาลอยด์ เรียกส่วนนี้ว่าผลสกัดดิบ-แอลคาลอยด์ (crude alkaloid)

3.1.1 ผลการแยกผลสกัดดิบแอลคาลอยด์และการทำให้บริสุทธิ์

ในการนำผลสกัดดิบแอลคาลอยด์จากข้อ 3.1 11.5 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 85 เซนติเมตร โดยใช้แอลูมินา 400 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนร้อยละ 2, 5, 10, 30, 40, 60 และ 80 (โดยปริมาตร) คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 (โดยปริมาตร) และเมทานอลตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังตาราง 5

ตาราง 5 ผลการแยกผลสกัดดิบนอลคาลอยด์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์		ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
เฮกเซน		1 - 5	น้ำมันใส
คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน	ร้อยละ 2	1 - 9	สารเหนียวสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 5	1 - 5	สารเหนียวสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 10	1 - 3	สารเหนียวสีเหลืองอ่อนปนผลึกสีขาว
		4 - 9	ผลึกสีขาว
		10 - 11	คราบสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 30	1 - 4	คราบสีเหลืองอ่อน
		5 - 7	ตะกอนสีเหลือง
	ร้อยละ 40	1 - 4	คราบสีเหลือง
		5	สารเหนียวสีเหลือง
		6 - 7	สารสีเหลืองปนตะกอนละเอียด
	ร้อยละ 60	1 - 6	สารเหนียวสีน้ำตาล
	ร้อยละ 80	1 - 3	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
		4 - 7	สารสีน้ำตาลปนตะกอนขาว
คลอโรฟอร์ม		1 - 3	ตะกอนสีเหลืองอ่อน
		4	สารสีน้ำตาลปนตะกอนขาวชั้นบน
		5 - 8	สารเหนียวสีน้ำตาล
		9 - 11	สารเหนียวสีน้ำตาลปนตะกอน
		12	คราบสีเหลืองปนตะกอน
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม	ร้อยละ 5	1 - 7	สารสีน้ำตาลดำปนตะกอน
		8 - 15	คราบสีเหลืองปนตะกอน
		16 - 25	สารสีน้ำตาลดำปนตะกอน
		26 - 30	สารสีเหลืองปนตะกอน
	ร้อยละ 10	1 - 5	คราบสีเหลืองปนตะกอน
		6 - 8	คราบสีน้ำตาลดำ
	ร้อยละ 20	1 - 10	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ

ตาราง 5 (ต่อ)

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์		ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
เมทานอล:คลอโรฟอร์ม	ร้อยละ 30	1 - 2	คราบสีเหลือง
		3 - 14	สารสีน้ำตาลปนตะกอน
	ร้อยละ 40	1 - 9	คราบสีเหลือง
	ร้อยละ 50	1 - 8	คราบสีเหลือง
	ร้อยละ 60	1 - 5	คราบสีน้ำตาล
เมทานอล		1 - 5	สารสีน้ำตาลปนตะกอนขาว

จากตาราง 5 จะเห็นได้ว่าสารในแต่ละลำดับส่วนที่แยกได้ส่วนมากมีสีน้ำตาลหรือเป็นคราบสีเหลือง มีปริมาณน้อย ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ แต่มีลำดับส่วนที่ 1-9 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วยร้อยละ 10 ของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ได้สารหนัก 0.73 กรัม นำมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซีเตตกับเมทานอล ตกผลึกใหม่ในเมทานอลร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 186-188 องศาเซลเซียส หนัก 54 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร ก.

3.1.2 <u>ผลการแยกผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตและการทำให้บริสุทธิ์</u>

แบ่งผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตจากข้อ 3.1 17.3 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้แฟลชคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 60 เซนติเมตร โดยใช้แอลูมินา 605.5 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนร้อยละ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 และ 90 (โดยปริมาตร) คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 5, 10, 20, 30, 50, 60 และ 80 (โดยปริมาตร) และเมทานอลตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการแยกผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์		ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
เฮกเซน		1 - 5	-
คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน	ร้อยละ 5	1 - 7	ขี้ผึ้งสีขาว
	ร้อยละ 10	1 - 6	ผลึกสีขาว
	ร้อยละ 20	1 - 5	ขี้ผึ้งสีเหลือง
		6 - 9	ผลึกสีขาว
	ร้อยละ 30	1 - 5	สารสีเหลืองอ่อนปนผลึกสีขาว
		6	สารสีเหลืองเข้มปนผลึกสีขาว
		7	สารสีส้มปนผลึกสีขาว
		8 - 9	สารสีเหลืองอมเขียวปนผลึกสีขาว
	ร้อยละ 40	1 - 5	สารเหนียวสีน้ำตาล
		6 - 8	สารเหนียวสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 50	1 - 5	สารเหนียวสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 70	1 - 6	คราบสีเหลืองเข้ม
	ร้อยละ 90	1 - 6	สารเหนียวสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม		1 - 5	สารเหนียวสีน้ำตาล
		6 - 8	คราบสีเหลืองเข้ม
เมทานอล: คลอโรฟอร์ม	ร้อยละ 5	1 - 8	สารสีน้ำตาลดำ
	ร้อยละ 10	1 - 8	สารสีน้ำตาลดำ
	ร้อยละ 20	1 - 8	สารสีน้ำตาล
	ร้อยละ 30	1 - 6	สารสีเหลือง
	ร้อยละ 50	1 - 7	คราบสีน้ำตาล
	ร้อยละ 60	1 - 8	คราบสีดำ
	ร้อยละ 80	1 - 10	คราบสีเหลือง
เมทานอล		1 - 5	สารสีน้ำตาลปนตะกอนขาว

จากการแยกผลสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต แยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด ชนิดแรกได้จากลำดับส่วนที่ 1-6 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วย ร้อยละ 10 ของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน และลำดับส่วนที่ 6-9 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วย ร้อยละ 20 ของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน รวมสารได้ 1.54 กรัม นำมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซิเตตกับเมทานอลร้อน ล้างผลึกที่ได้ด้วยเมทานอล แล้วนำมาตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 216-218 องศาเซลเซียส หนัก 240 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร ข.

<u>การไฮโดรไลซ์สาร ข.</u>

นำสาร ข. 100 มิลลิกรัม มารีฟลักซ์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 ในเอทานอล 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ระเหยตัวทำละลายออกได้ของแข็งสีขาว นำมาตกผลึกหลาย ๆ ครั้ง ในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเอทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 212-214 องศาเซลเซียส หนัก 68 มิลลิกรัม

สารชนิดที่ 2 ที่แยกได้จากผลสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต ได้จากลำดับส่วนที่ 6-9 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วยร้อยละ 30 ของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ได้สารหนัก 2.21 กรัม นำมาตกผลึกในเอทิลแอซิเตตหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 134 องศาเซลเซียส หนัก 780 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร ค.

3.2 <u>ผลการแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผลสกัดด้วยน้ำ</u>

3.2.1 <u>ผลการแยกสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และการทำให้บริสุทธิ์</u>

ในการนำผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 20 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้แฟลชคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 60 เซนติเมตร โดยใช้อลูมินา 600 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนร้อยละ 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 70 (โดยปริมาตร) คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 2, 10, 20, 30, 40, 60 และ 80 (โดยปริมาตร) และเมทานอลตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ผลดังตาราง 7

ตาราง 7 ผลการแยกผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์		ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารที่แยกได้
เฮกเซน		1 - 8	-
คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน	ร้อยละ 5	1 - 9	ขี้ผึ้งสีขาว
	ร้อยละ 10	1	ขี้ผึ้งสีขาวปนของแข็งสีขาว
		2	ขี้ผึ้งสีเหลืองปนของแข็งสีขาว
		3	ขี้ผึ้งสีขาวปนของแข็งสีขาว
		4 - 6	ขี้ผึ้งสีเหลืองอ่อน
	ร้อยละ 20	1 - 6	สารสีเหลืองปนของแข็งสีขาว
	ร้อยละ 30	1 - 2	สารสีเหลืองปนของแข็งสีขาว
		3 - 5	สารสีม่วงอ่อนปนของแข็งสีขาว
		6 - 7	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
		8 - 9	สารสีเหลืองปนผลึกสีขาว
	ร้อยละ 40	1	สารสีเหลืองอ่อนปนผลึกสีขาว
		2 - 4	สารสีเหลืองเข้มปนผลึกสีขาว
		5	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
		6	สารสีน้ำตาลดำปนตะกอนละเอียด
		7 - 10	สารสีน้ำตาลดำ
	ร้อยละ 50	1 - 7	สารสีน้ำตาลอ่อน
	ร้อยละ 70	1 - 7	สารสีเหลือง
คลอโรฟอร์ม		1 - 8	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
เมทานอล: คลอโรฟอร์ม	ร้อยละ 2	1 - 7	สารสีน้ำตาล
	ร้อยละ 10	1 - 9	สารสีน้ำตาลดำ
	ร้อยละ 20	1 - 8	สารสีน้ำตาลดำปนตะกอน
	ร้อยละ 30	1 - 7	สารสีน้ำตาลดำปนตะกอน
	ร้อยละ 40	1 - 8	คราบสีน้ำตาลปนตะกอน
	ร้อยละ 60	1 - 11	คราบสีน้ำตาลปนตะกอน
	ร้อยละ 80	1 - 6	คราบสีเหลือง
เมทานอล		1 - 10	สารสีน้ำตาลปนผลึกรูปสี่เหลี่ยม

ผลการแยกสารในตารางที่ 7 สารที่แยกได้ส่วนมากมีสีน้ำตาลและมีตะกอนปน แต่มีปริมาณน้อยไม่สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ แต่มีลำดับส่วนที่ 8-9 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วยร้อยละ 30 ของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน และลำดับส่วนที่ 1-4 ที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วยร้อยละ 40 ของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนรวมสารได้ 3.48 กรัม นำมาตกผลึกในเอทานอลร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส หนัก 840 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร ง.

3.2.2. <u>ผลการแยกผลสกัดด้วยน้ำ</u>

จากการแบ่งผลสกัดด้วยน้ำในข้อ 2.2 18 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้แฟลชคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 60 เซนติเมตร โดยใช้แอลูมินา 600 กรัม เป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากดังนี้ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75(โดยปริมาตร) และเมทานอลตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะได้ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละลำดับส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตร 10-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสารในแต่ละลำดับส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลการแยกส่วนมากได้สารสีเหลืองและสีน้ำตาลมีตะกอนปนบ้างแต่มีปริมาณน้อยมากไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ จึงไม่แสดงตารางผลการแยกผลสกัดด้วยน้ำไว้

4. <u>การวิเคราะห์สาร</u>

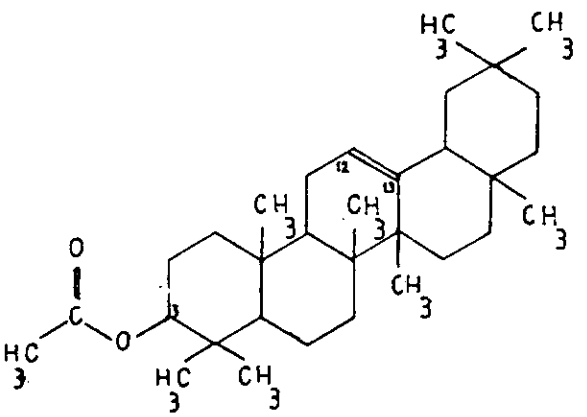
4.1 <u>การวิเคราะห์สาร ก.</u> (จุดหลอมเหลว 186 - 188 องศาเซลเซียส) สาร ก. ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และเอทิลแอซีเตต ละลายได้บ้างในเอทานอล และไม่ละลายในเมทานอล ให้ผลสีม่วงแดงกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด มีค่า Rf 0.52 (ซิลิกาเจล /ร้อยละ 50 คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน)

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν^{KBr}_{max} (cm^{-1}) 2900-2850 (การยืด C-H ของ-CH_3และ-CH_2),1730(การยืด C=O),1460(การงอ C-H ของ -CH_2),1380-1360 (การงอ C-H ของ -CH_3),1250(การยืด C-O),1020(การยืด C-O) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 8

^{1}H NMRสเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ(ppm) 0.88-2.17 (-CH,-CH_2,-CH_3),2.08(CH_3-C=O),4.48(-CH-O),5.15(-CH=C) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 9

แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e และร้อยละความเข้มสัมพัทธ์ได้ M^+ 468(6.0) ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_2$, 408(8.0), 218(100.0) และ 203(35.0) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 10

เนื่องจากสาร ก. มีปริมาณน้อยไม่สามารถนำมาทดสอบเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างได้ แต่จากสมบัติต่าง ๆ ของสาร ก.ได้แก่ จุดหลอมเหลว การละลาย การทำปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด สเปกตรัมของสาร ก. และจากการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสาร ก. กับเบต้า-แอไมรินแอซิเตต (β-amyrin acetate) และกรด 3เบต้า-แอซีทิลโอลีโนลิค (3 β-acetyl oleanolic acid) ทำให้คาดว่าสาร ก.คือ เบต้า-แอไมรินแอซิเตต สารนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_2$ และมีสูตรโครงสร้างดังนี้



เบต้า-แอไมรินแอซิเตต

4.2 <u>การวิเคราะห์สาร ข.</u> (จุดหลอมเหลว 216 - 218 องศาเซลเซียส) สาร ข. ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และเอทิลแอซิเตต ละลายได้บ้างในเอทานอล และไม่ละลายในเมทานอล ให้ผลสีม่วงแดงกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด มีค่า Rf 0.46(ซิลิกาเจล/ร้อยละ 50 คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน) จากการทดลองพบว่าสาร ข. มีค่า Rf เท่ากับลูพีออลแอซิเตต (lupeol acetate) และจุดหลอมเหลวของสารผสมลูพีออลแอซิเตตกับสาร ข.ในอัตราส่วน 1:1 ได้ 215-217 องศาเซลเซียส

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3090(การยืด C-H ของ $=CH_2$), 2940-2860(การยืด C-H ของ$-CH_3$ และ$-CH_2$), 1735(การยืด C=O), 1640(การยืด C=C), 1455(การงอ C-H ของ $-CH_2$), 1395-1365(การงอ C-H ของ $-CH_3$), 1250(การยืด C-O), 1050(การยืด C-O),980 และ880(การงอนอกระนาบ C-H ของ $=CH_2$) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 11

^{1}H NMRสเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ(ppm) 0.78-2.35 (-CH,-CH_2,-CH_3), 2.09(CH_3-C=O), 4.45(-CH-O), 4.55, 4.65(CH_2=C) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 12

แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e และร้อยละความเข้มสัมพัทธ์ได้ M^+ 468(27.5) ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_2$,453(10.0),408(31.0),218(20.0) และ 189(100.0) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 13

<u>ผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.</u> (จุดหลอมเหลว 212-214 องศาเซลเซียส) ผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และเอทิลแอซีเตต ละลายได้บ้างในเอทานอลและไม่ละลายในเมทานอล ให้ผลสีม่วงแดงกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด มีค่า Rf 0.63 (ซิลิกาเจล / ร้อยละ 50 คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน)

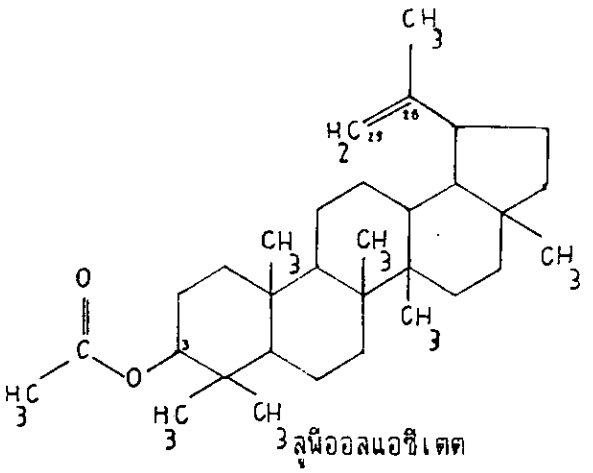
การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν^{KBr}_{max} (cm^{-1}) 3300(การยืด O-H), 3090 (การยืด C-H ของ =CH_2), 2950-2850 (การยืด C-H ของ-CH_3 และ -CH_2), 1640 (การยืด C=C), 1445(การงอ C-H ของ -CH_2), 1370(การงอ C-H ของ -CH_3), 1040 (การยืด C-O) และ 880 (การงอนอกระนาบ C-H ของ =CH_2) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 14

^{1}H NMR สเปกตรัม (300 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 0.67-2.37 (-CH,-CH_2,-CH_3),3.18(CH-O-),4.57,4.68(CH_2=C) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 15

^{13}C NMR สเปกตรัม (75 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 14.56-55.31 (-C,-CH,-CH_2,-CH_3),79.01(C-OH),109.32 (=CH_2) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 16

แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e และร้อยละความเข้มสัมพัทธ์ได้ M^+ 426(67.0) ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{50}O$, 218 (57.0), 207(70.9) และ189(100.0) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 17

จากสมบัติต่าง ๆ ของสาร ข. ได้แก่ จุดหลอมเหลว การละลาย การเปรียบเทียบค่า Rf กับลูพีออลแอซีเตต การนำสาร ข. มาหาจุดหลอมเหลวผสมกับลูพีออลแอซีเตต การทำปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด และทดสอบยืนยันผลด้วยการไฮโดรไลซ์สาร ข.แล้วได้ลูพีออล ทำให้สรุปได้ว่าสาร ข. คือ ลูพีออลแอซีเตต สารนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_2$ และสูตรโครงสร้างดังนี้



ลูพีออลแอซีเตต

4.3 <u>การวิเคราะห์สาร ค.</u> (จุดหลอมเหลว 134 องศาเซลเซียส) สาร ค.ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ แอซีโทน และเอทิลแอซีเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอทานอล และเมทานอล ให้ผลสีเขียวกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด มีค่า Rf 0.38 (ซิลิกาเจล /ร้อยละ 50 คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน) จากการทดลองพบว่า สาร ค. มีค่า Rf เท่ากับสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอล (β-sitosterol) กับสติกมาสเตอรอล (stigmasterol)

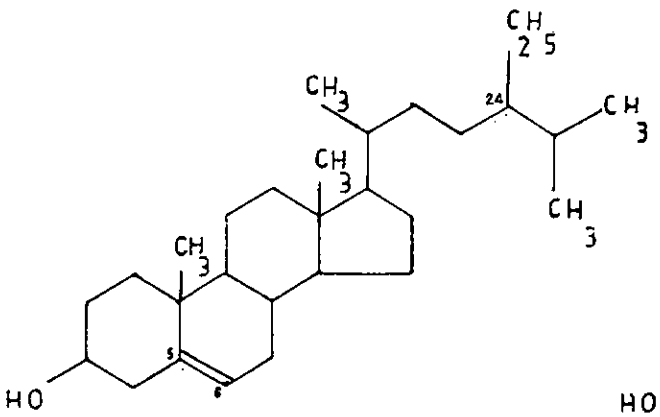
การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν^{KBr}_{max} (cm^{-1}) 3440 (การยืด O-H), 2940-2860 (การยืด C-H ของ-CH_3 และ -CH_2), 1650(การยืด C=C), 1460(การงอ C-H ของ -CH_2), 1385(การงอ C-H ของ -CH_3), 1060(การยืด C-O), 970-960 (การงอนอกระนาบ C-H ของ =CH-) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 18

^{1}H NMRสเปกตรัม (300 MHz, $CDCl_3$) ได้ค่า δ(ppm) 0.68-2.30 (-CH, -CH_2, -CH_3), 3.52(-CH-OH), 5.09(-HC=CH), 5.35(-C=CH) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 19

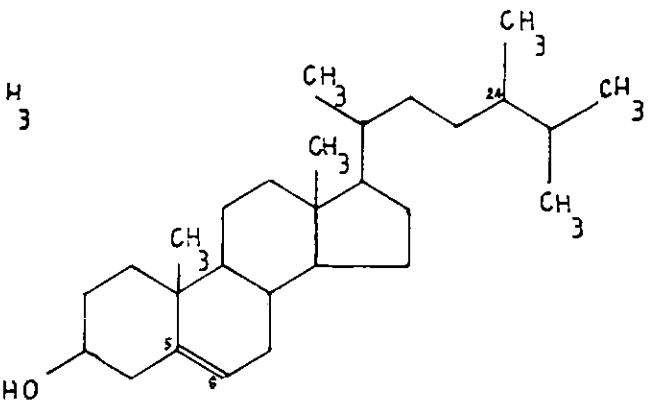
แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e และร้อยละความเข้มสัมพัทธ์ได้ M^+ 414(75.0), 412(100.0), 400(68.0) ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ และ$C_{28}H_{48}O$ ตามลำดับ 396(55.0), 382(48.0), 300(27.0), 255(67.0) และ213(34.0) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 20

แก๊สลิควิดโครมาโทแกรม ที่ได้จากการใช้คอลัมน์ OV-1 ร้อยละ 2 อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส ฉีดสารครั้งละ 1 ไมโครลิตร ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา มีอัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที แสดงพีค 3 พีค ที่รีเทนชันไทม์ (retention time) 18.30, 19.67 และ 22.37 นาที ปรากฏพีคดังภาพประกอบ 21

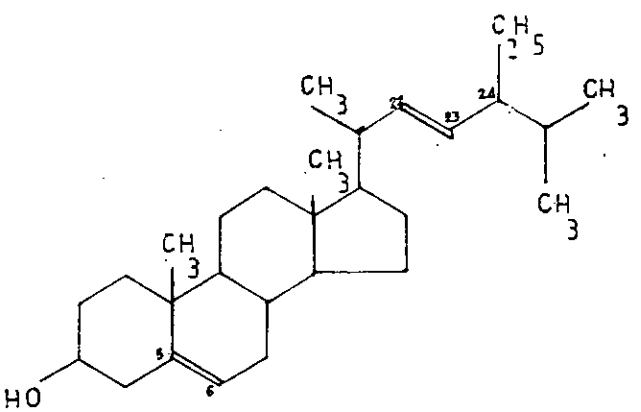
จากสมบัติต่าง ๆ ของสาร ค. ได้แก่ จุดหลอมเหลว การละลาย การเปรียบเทียบค่า Rf กับสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอล กับสติกมาสเตอรอล การทำปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด จากสเปกตรัมและแก๊สลิควิดโครมาโทแกรมของ สาร ค. ทำให้สรุปได้ว่าสาร ค. เป็นสารผสมของสเตอรอยด์ต่าง ๆ คือ เบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล(campesterol) ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ และ$C_{28}H_{48}O$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างของสารต่าง ๆ คือ



เบต้า-ไซโตสเตอรอล



แคมเปสเตอรอล



สติกมาสเตอรอล

4.4 <u>การวิเคราะห์สาร ง.</u> (จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส) สาร ง. ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ แอซีโทน และเอทิลแอซิเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอทานอล และเมทานอล ให้ผลลีเบียวกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด มีค่า Rf 0.38 (ซิลิกาเจล/ร้อยละ 50 คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน) จากการทดลองพบว่า สาร ง. มีค่า Rf เท่ากับสาร ค. และสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอลกับสติกมาสเตอรอล

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3400 (การยืด O-H), 2950-2800 (การยืด C-H ของ-CH_3 และ -CH_2), 1640(การยืด C=C), 1460(การงอ C-H ของ -CH_2), 1380(การงอ C-H ของ -CH_3), 1060(การยืด C-O), 970-960 (การงอนอกระนาบ C-H ของ =CH-) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 22

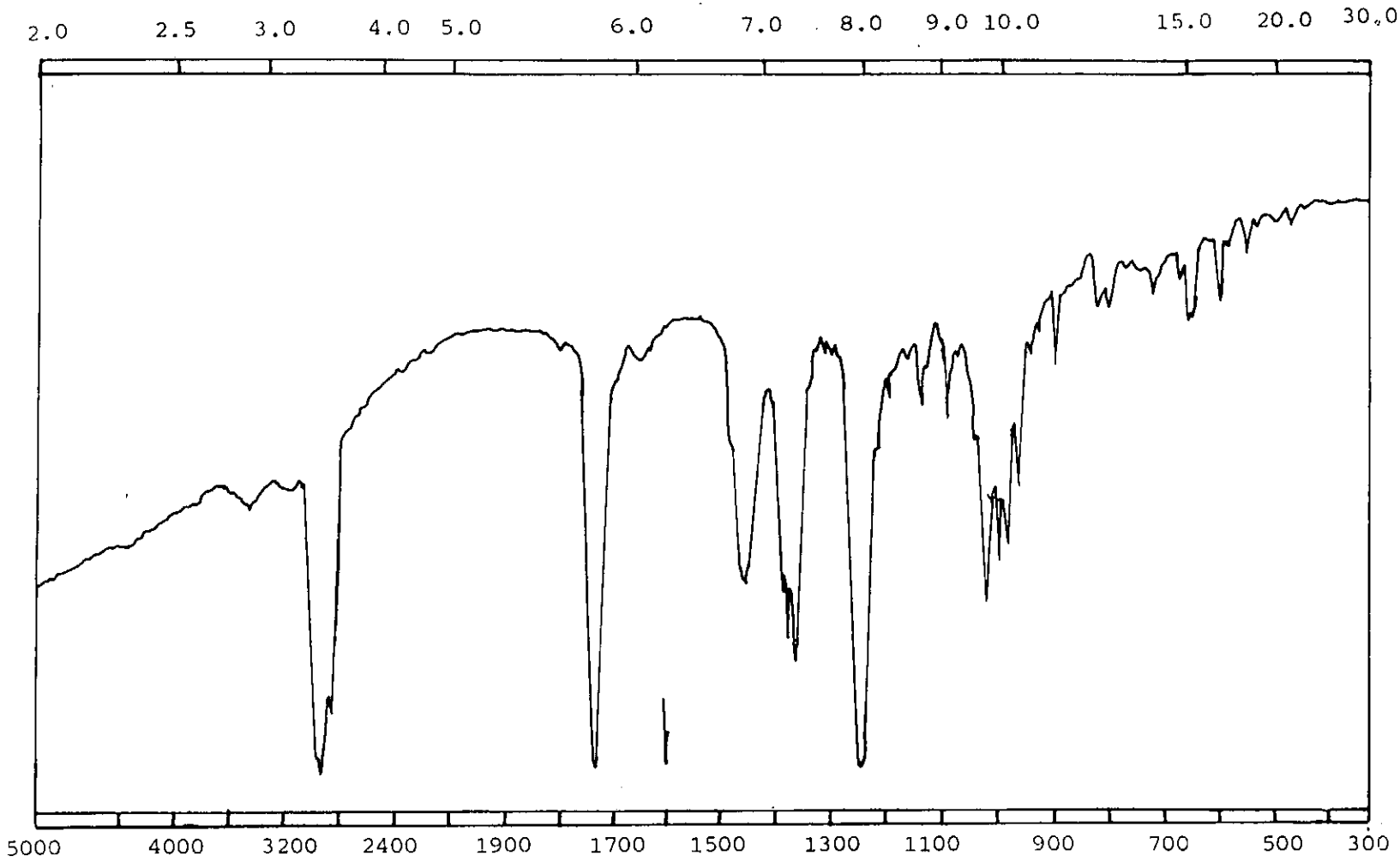
^{1}H NMRสเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ(ppm) 0.68-2.30 (-CH,-CH_2,-CH_3), 3.58(-CH-OH), 5.09(-HC=CH), 5.35(-C=CH) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 23

^{13}C NMRสเปกตรัม (75 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ(ppm) 11.87-56.88 (-C,-CH,-CH_2,-CH_3), 71.79(-C-OH), 121.70,140.76(-C=CH), 129.28,138.31 (-CH=CH) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 24

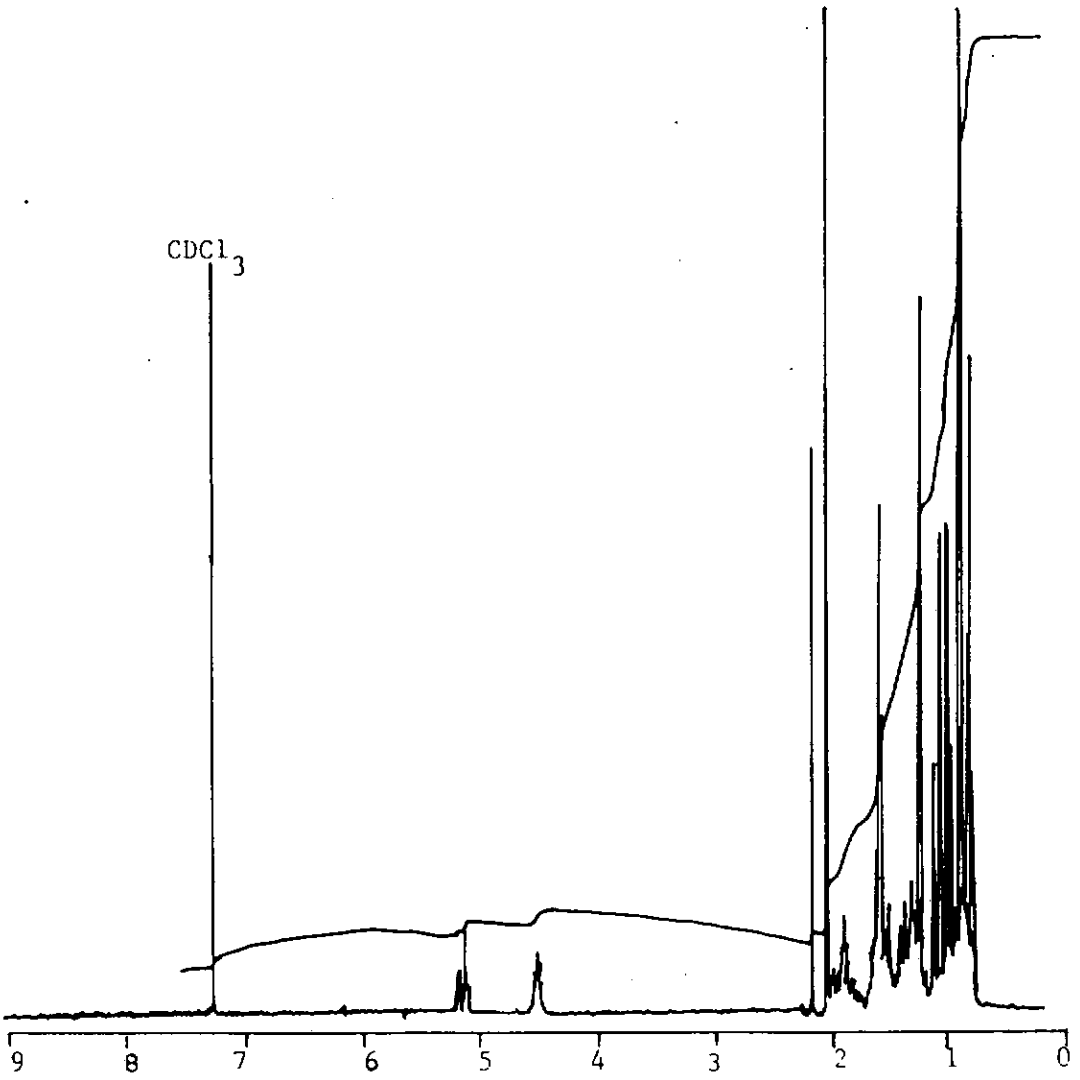
แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e และร้อยละความเข้มสัมพัทธ์ได้ M^+ 414(71.0), 412(92.0),400(100.0) ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ และ $C_{28}H_{48}O$ ตามลำดับ 382(40.0), 300(37.0), 273(40.5), 255(67.5) และ 213(54.0) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 25

แก๊สลิควิดโครมาโทแกรม ที่ได้จากการใช้คอลัมน์ OV-1 ร้อยละ 2 อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส ฉีดสารครั้งละ 1 ไมโครลิตร ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา มีอัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที แสดงพีค 3 พีค ที่รีเทนชันไทม์ 18.35, 19.72 และ22.42 นาที ปรากฏพีคดังภาพประกอบ 26

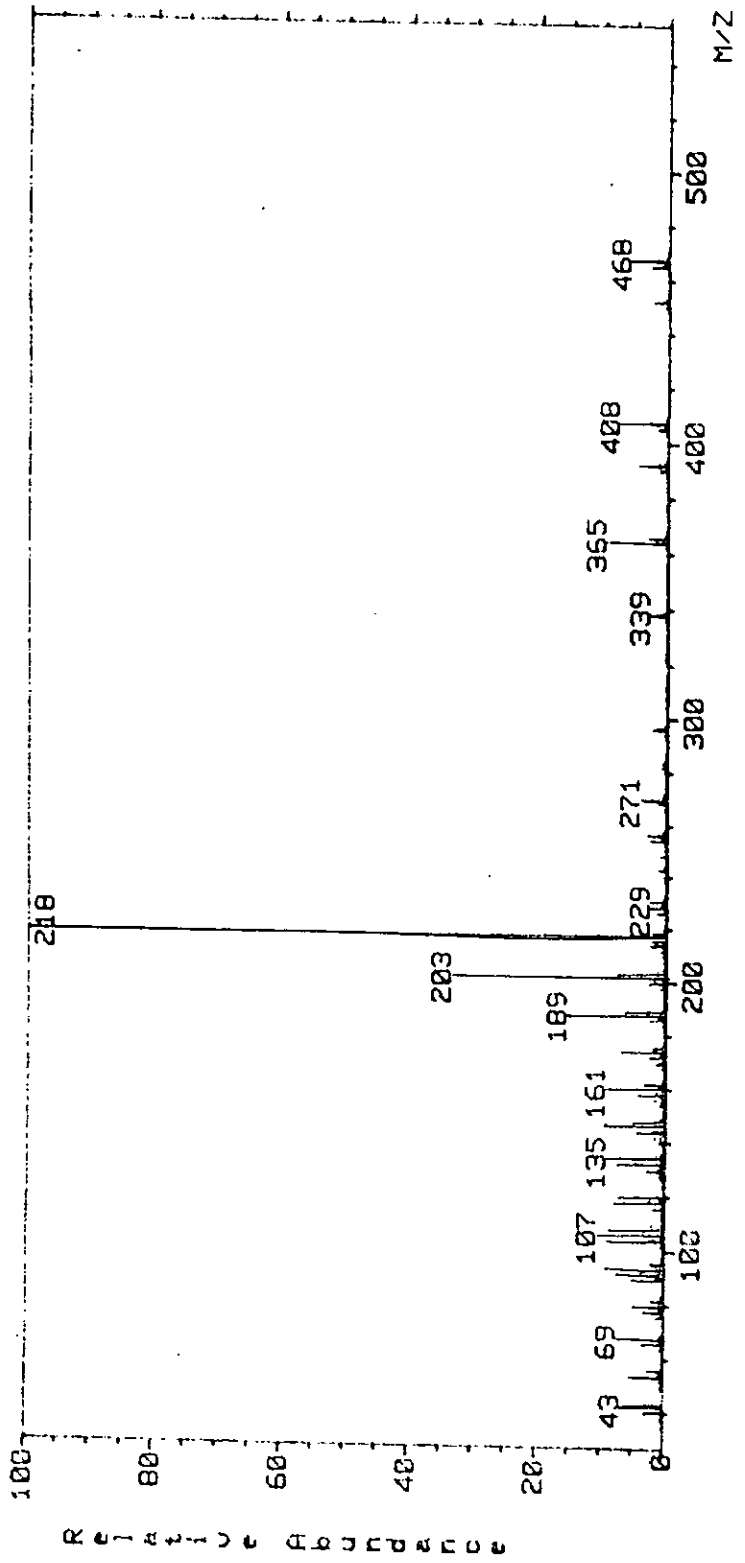
จากสมบัติต่าง ๆ ของสาร ง. ได้แก่ จุดหลอมเหลว การละลาย การเปรียบเทียบค่า Rf กับสาร ค. และสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอลกับสติกมาสเตอรอล การทำปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด จากสเปกตรัมและแก๊สลิควิดโครมาโทแกรมของสาร ง. ทำให้สรุปได้ว่าสาร ง. เป็นสารชนิดเดียวกับสาร ค. คือสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล



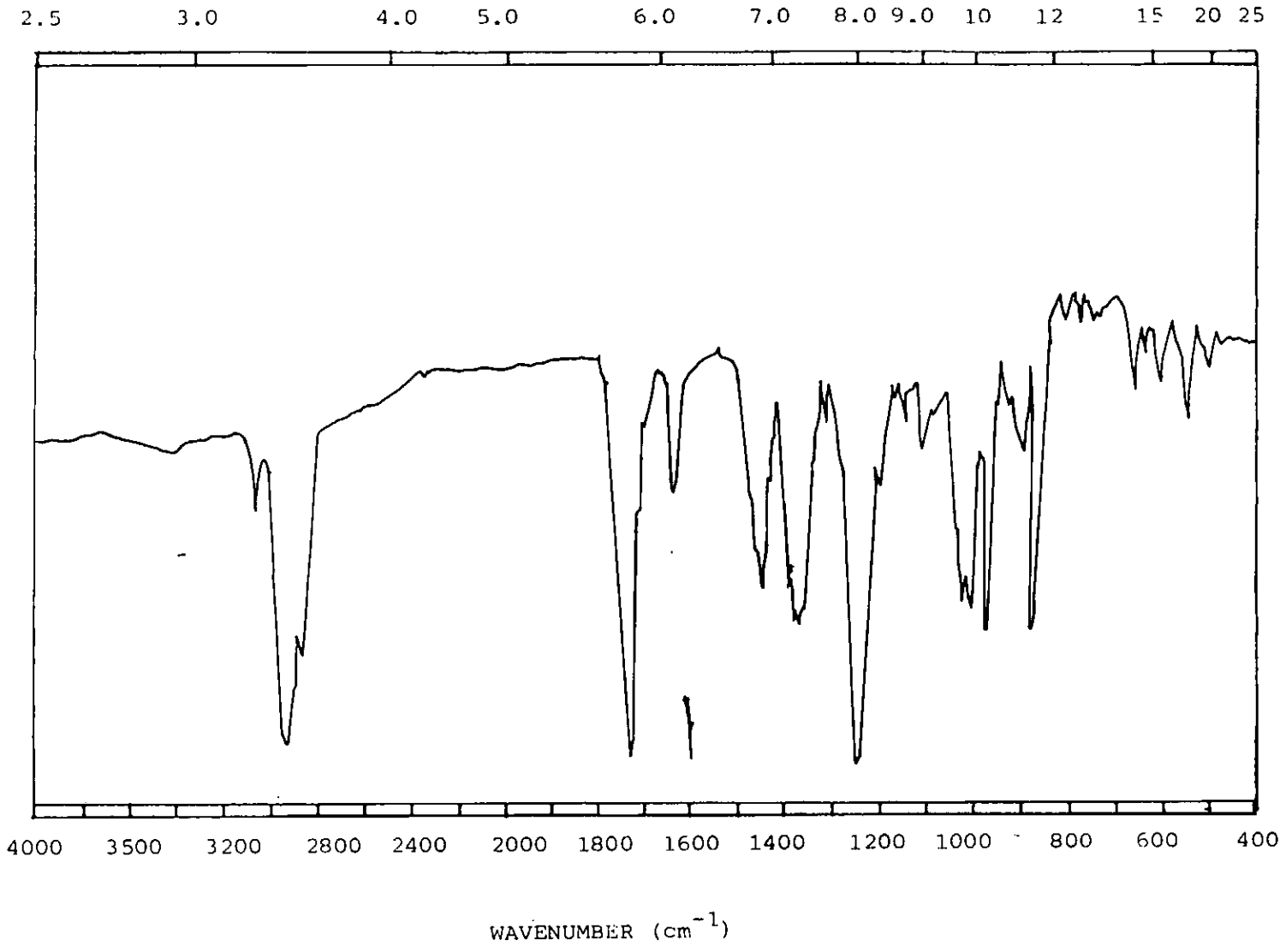
ภาพประกอบ 8 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ก.



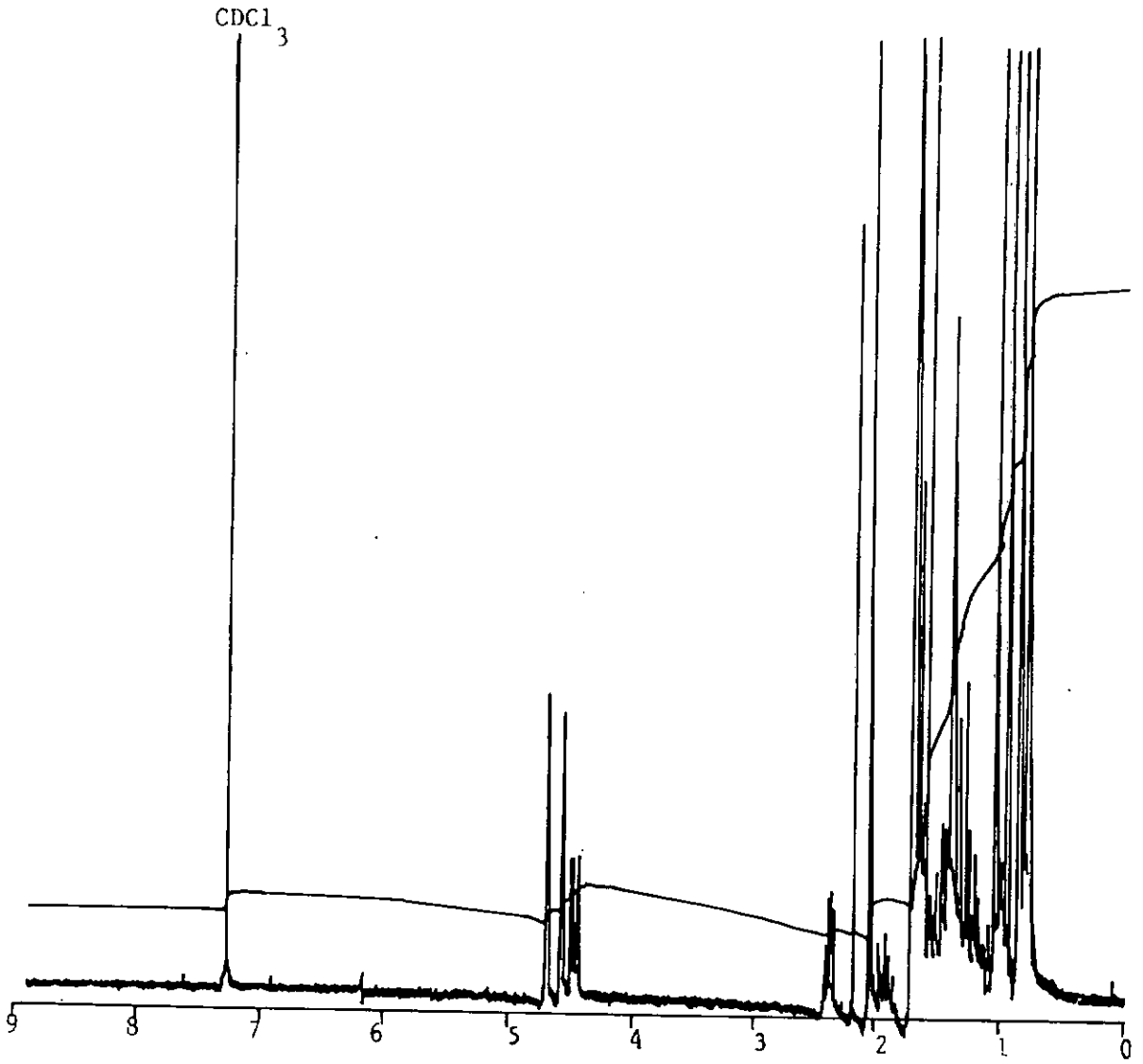
ภาพประกอบ 9 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ก.



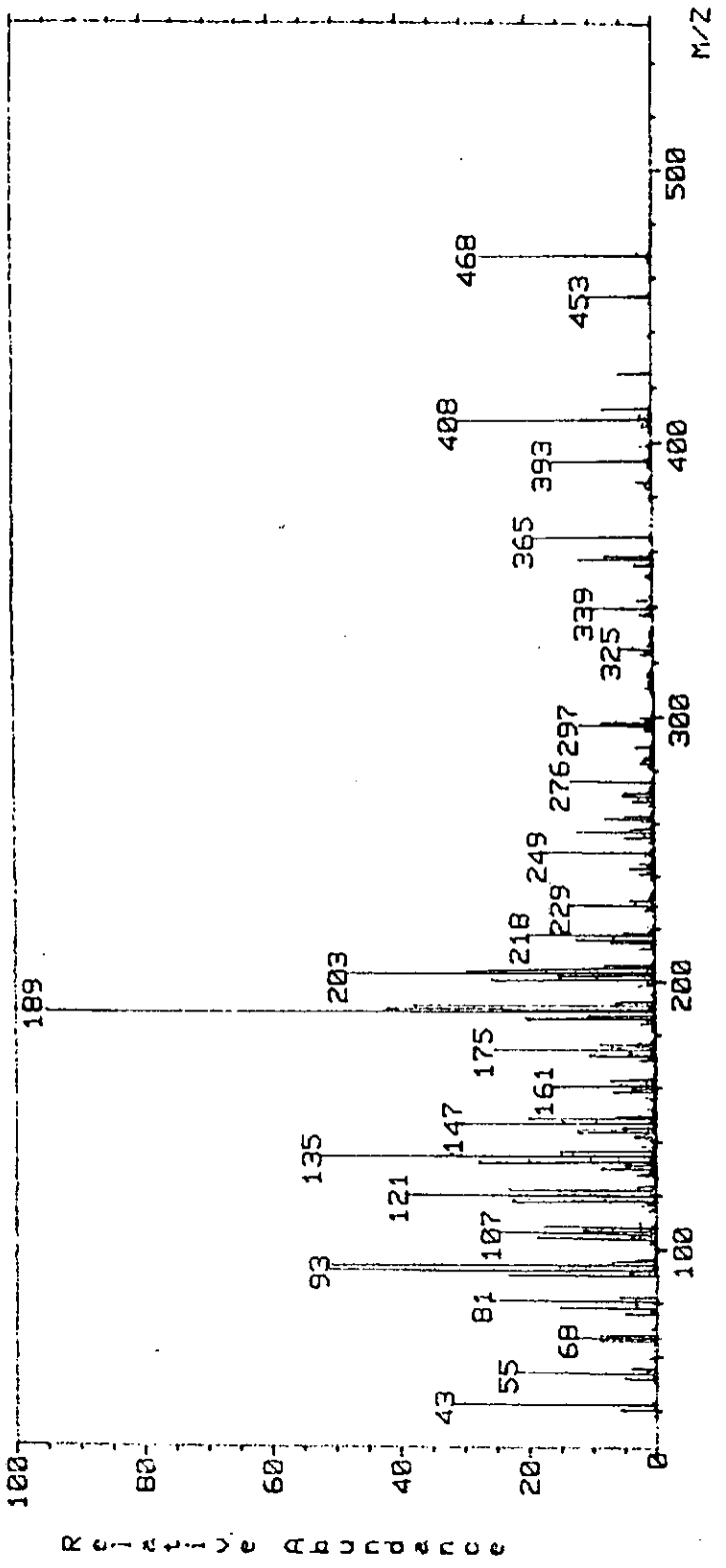
ภาพประกอบ 10 แมสสเปกตรัมของสาร ก.



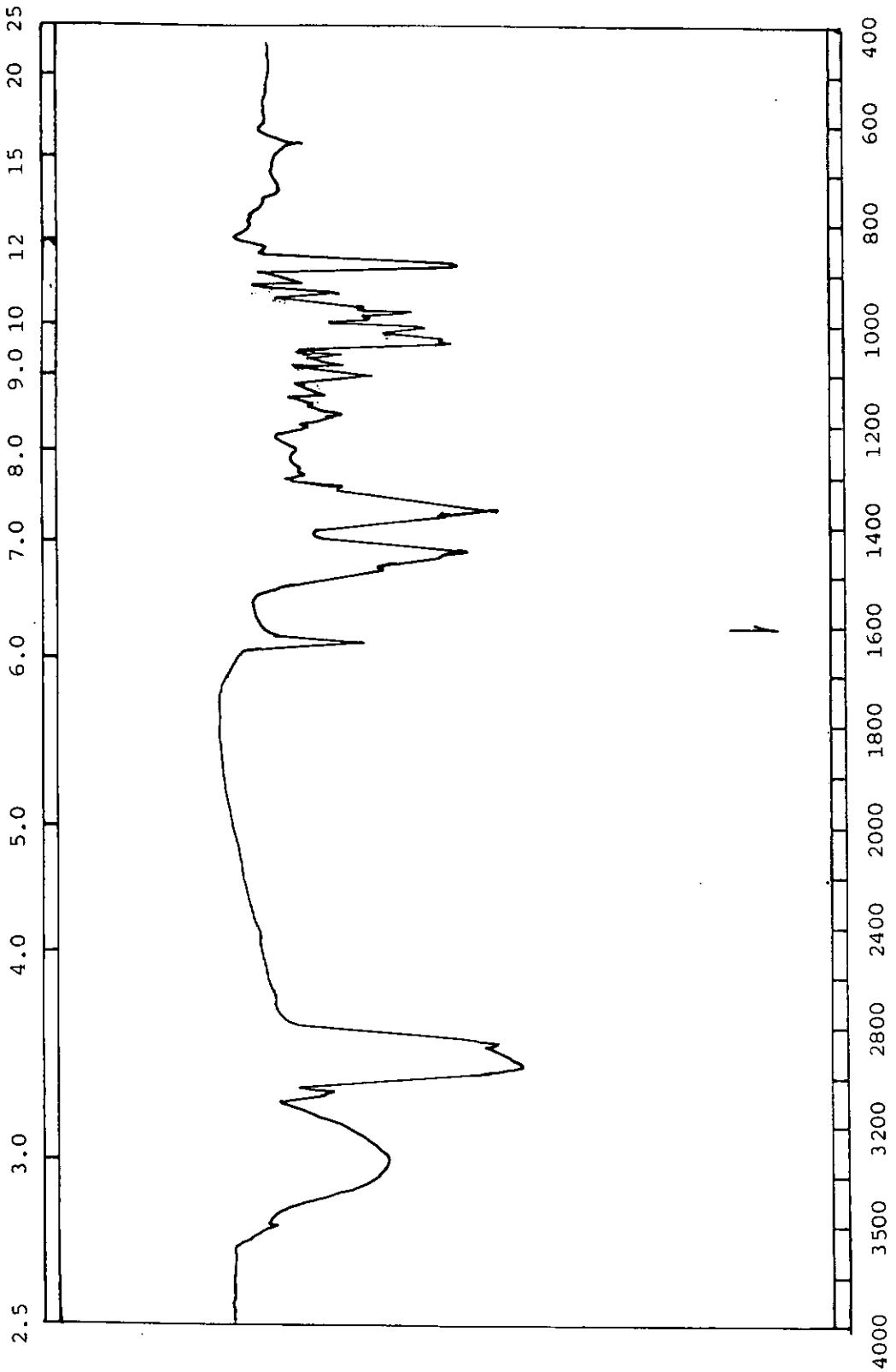
ภาพประกอบ 11 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ข.



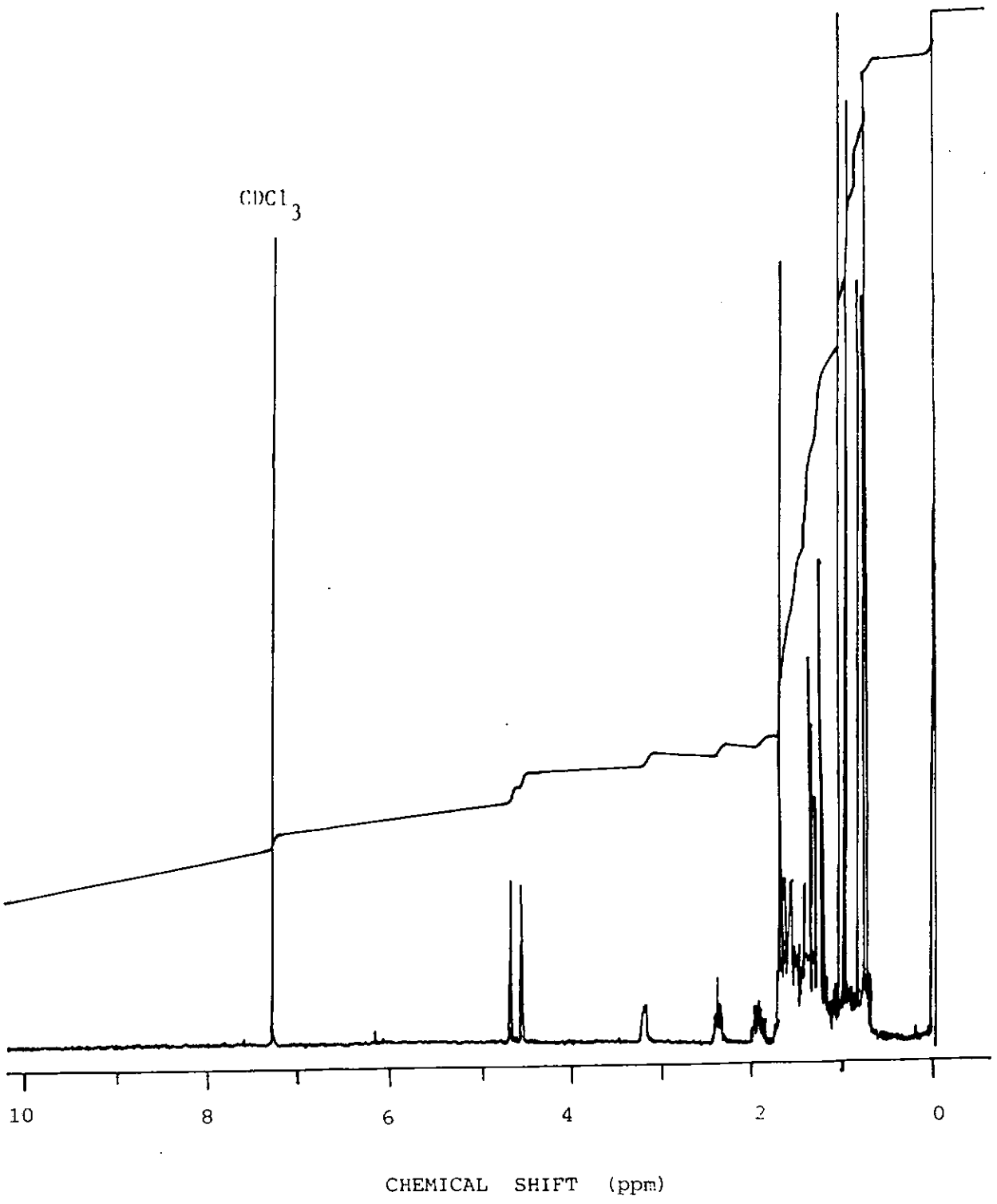
ภาพประกอบ 12 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ข.



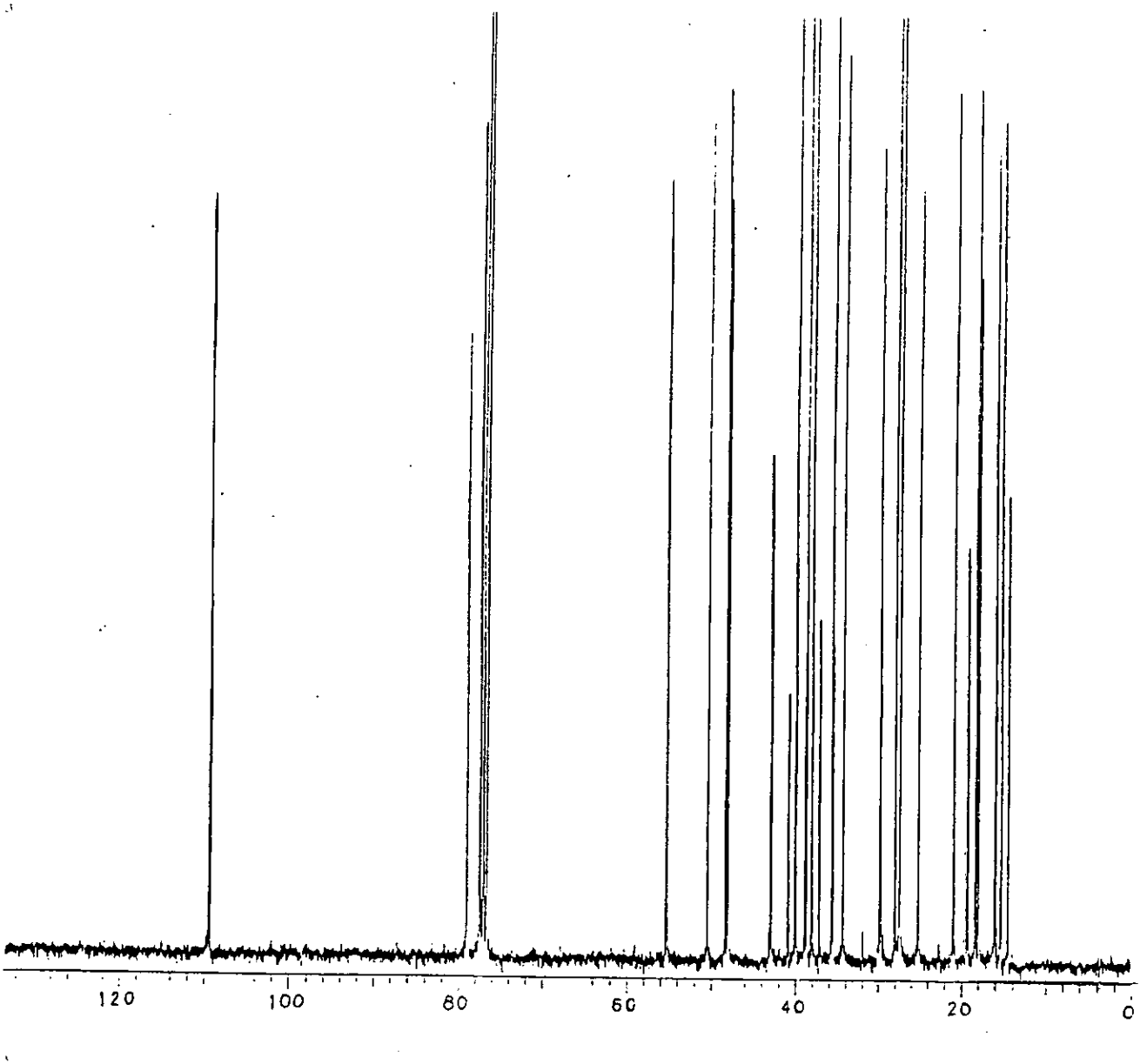
ภาพประกอบ 13 แมสสเปกตรัมของสาร ข.



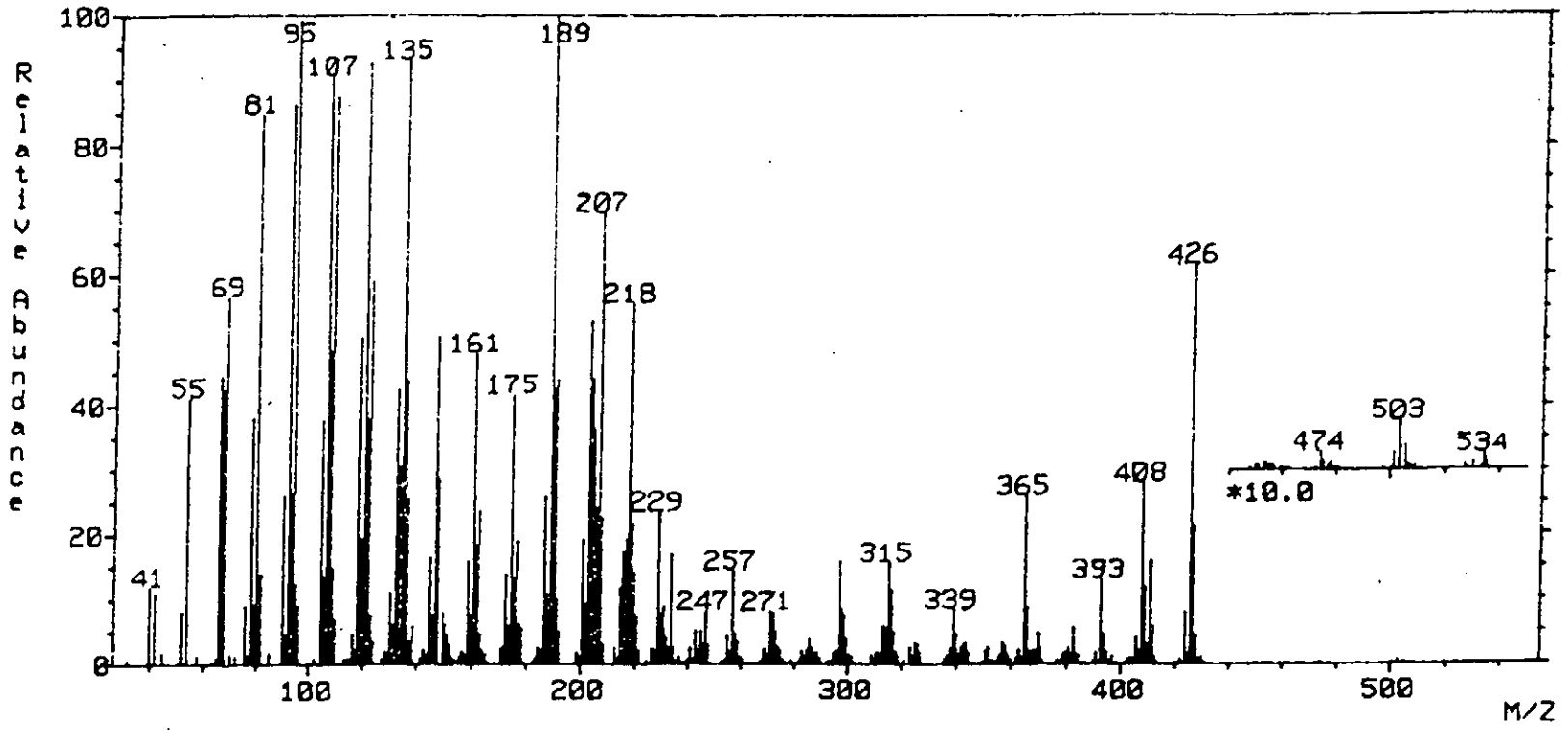
ภาพประกอบ 14 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.



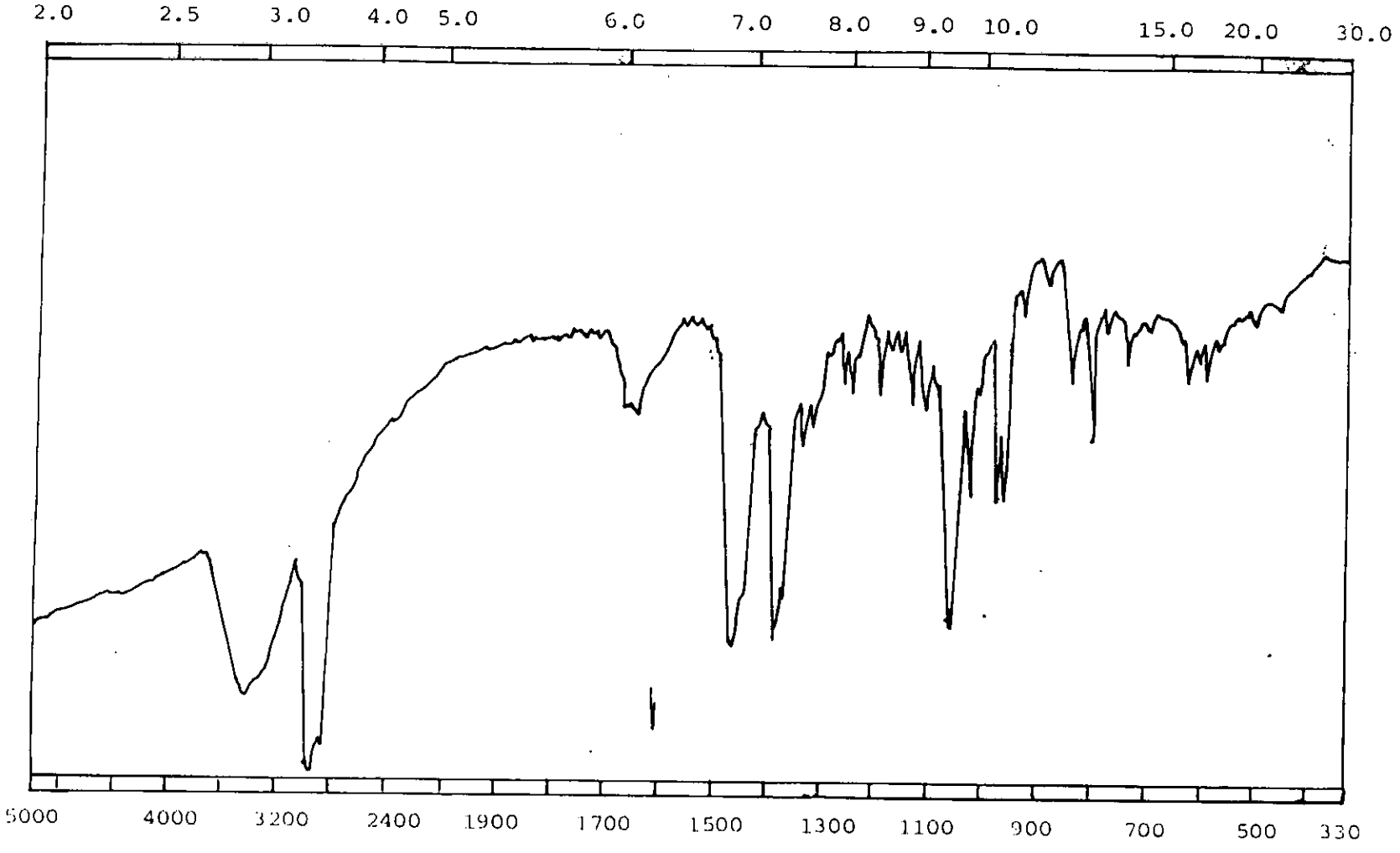
ภาพประกอบ 15 ^1H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.



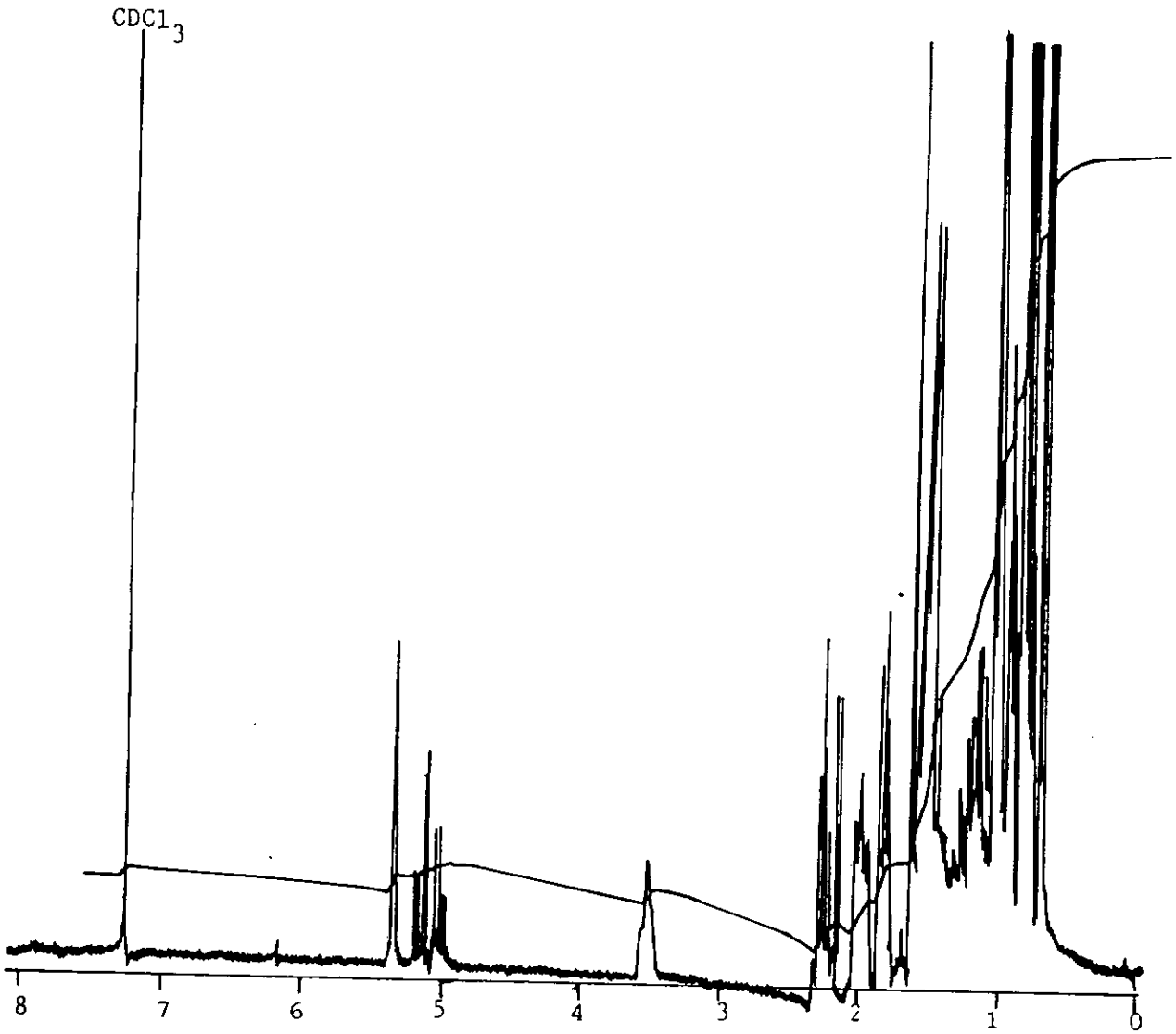
ภาพประกอบ 16 ^{13}C NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข



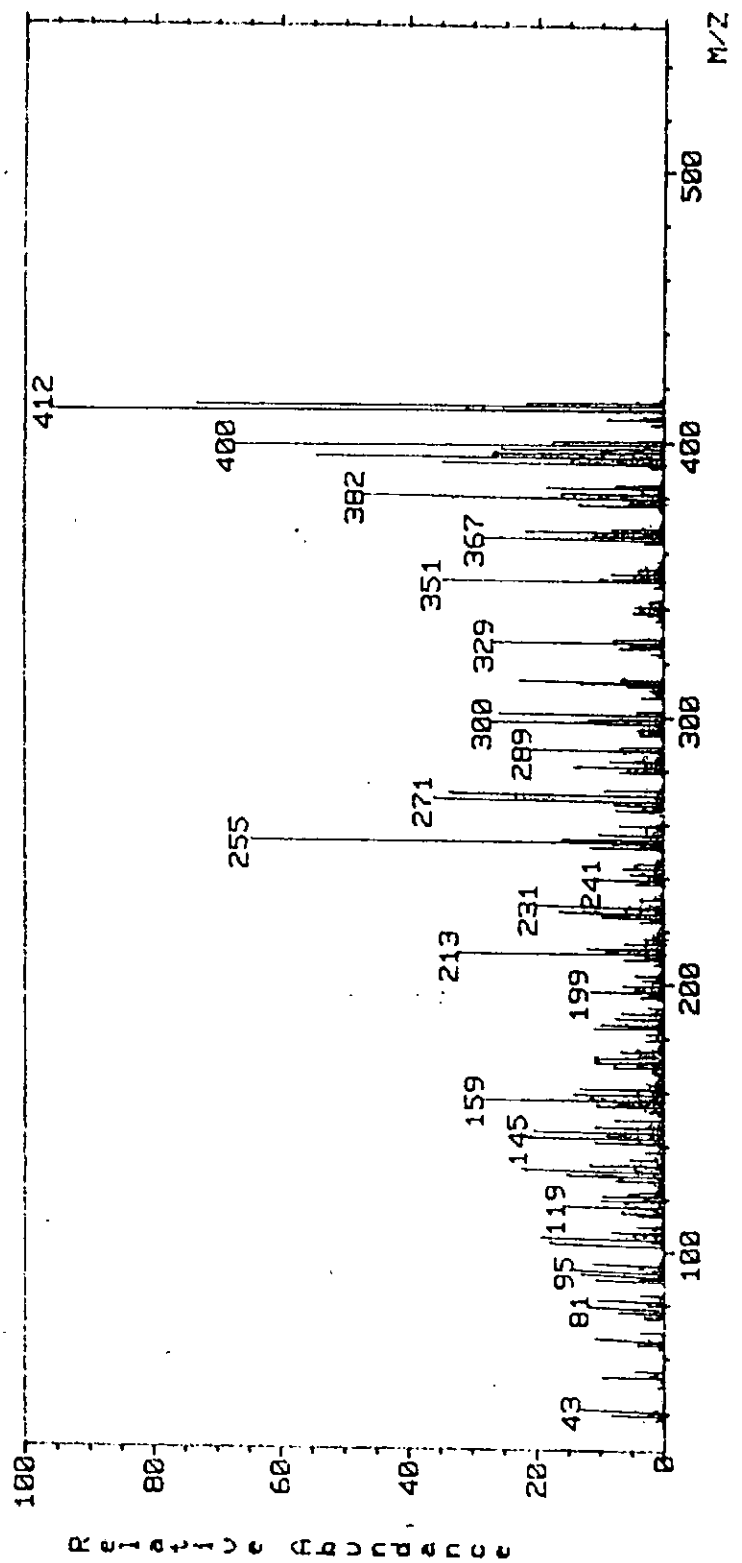
ภาพประกอบ 17 แมสสเปกตรัม ของผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.



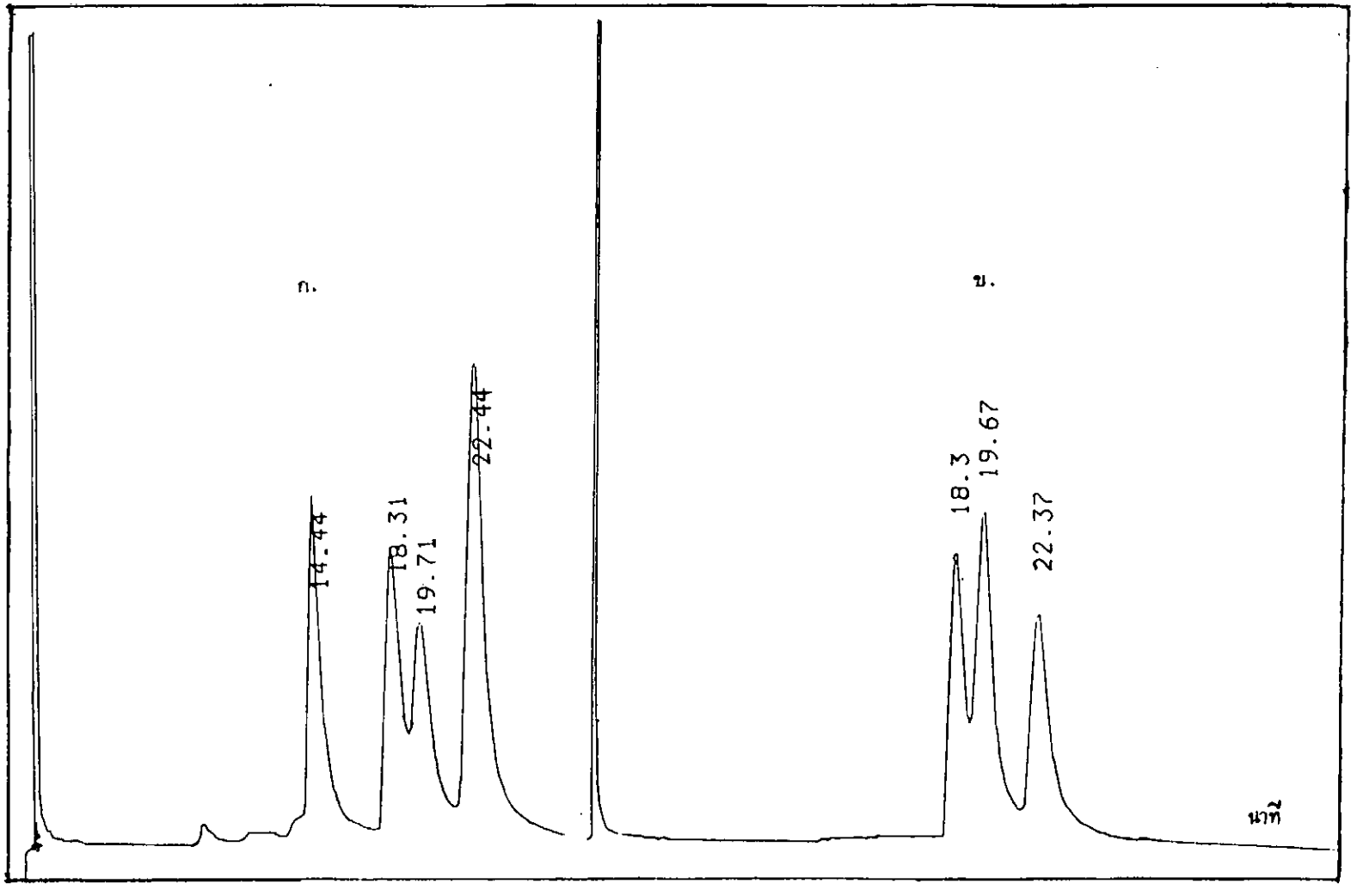
ภาพประกอบ 18 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ค.



ภาพประกอบ 19 ^1H NMR สเปกตรัมของสาร ค.



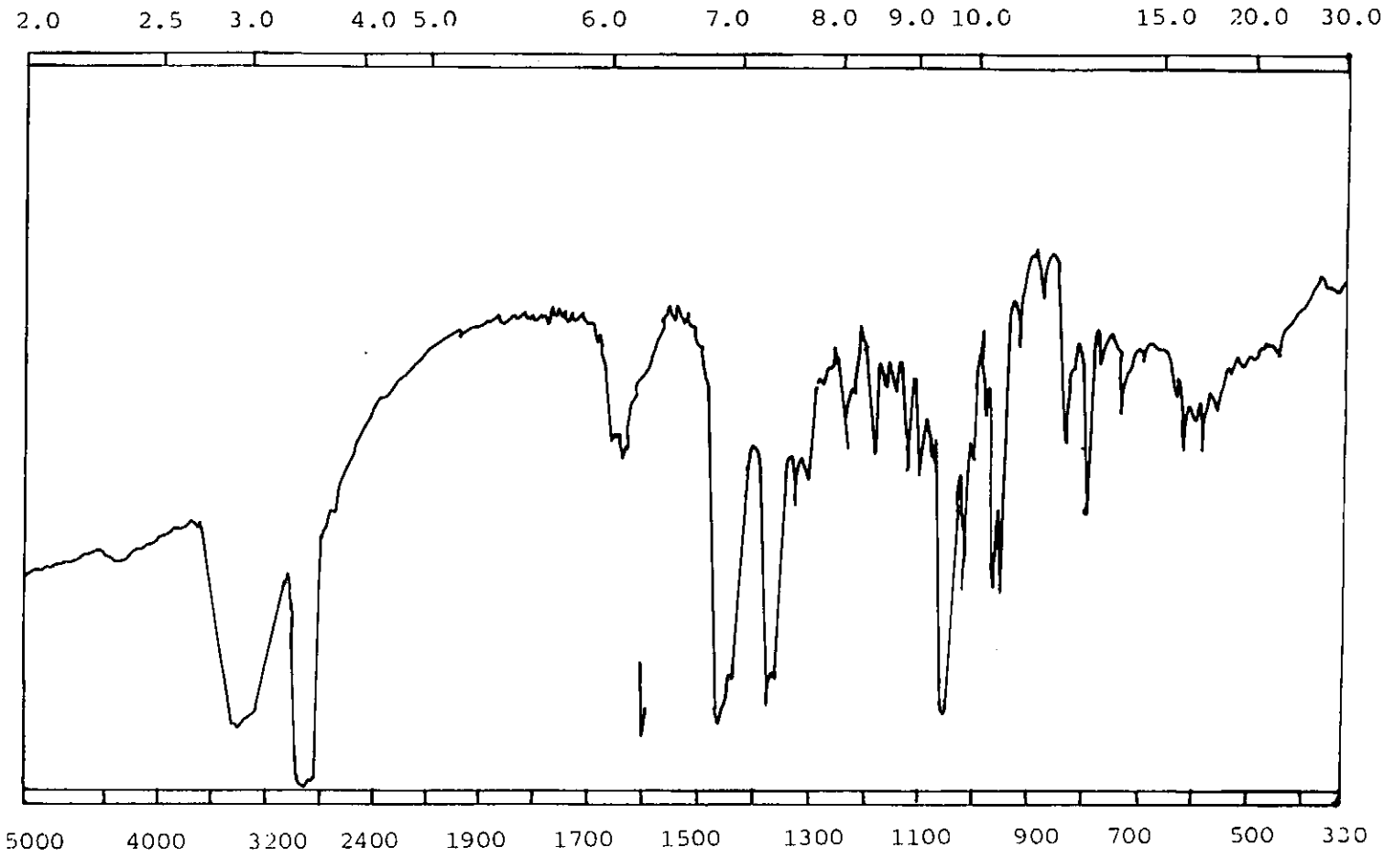
ภาพประกอบ 20 แมสสเปกตรัมของสาร ค.



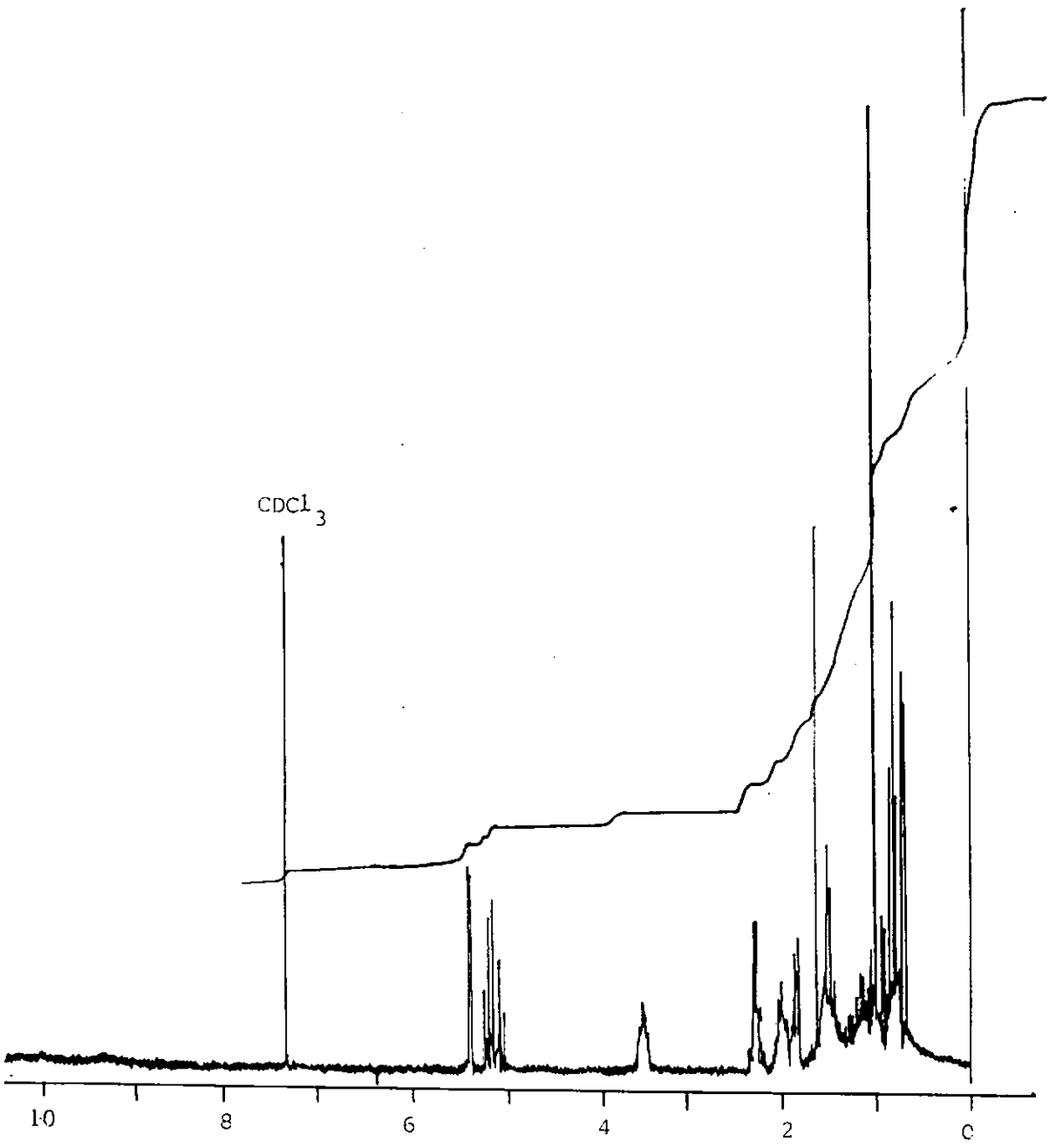
ภาพประกอบ 21 แก๊สลิควิดโครมาโทแกรมของสาร ค.

ก. พีคของคอเลสเตอรอล แคมเปสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และเบต้า-ไซโตสเตอรอล ตามลำดับ

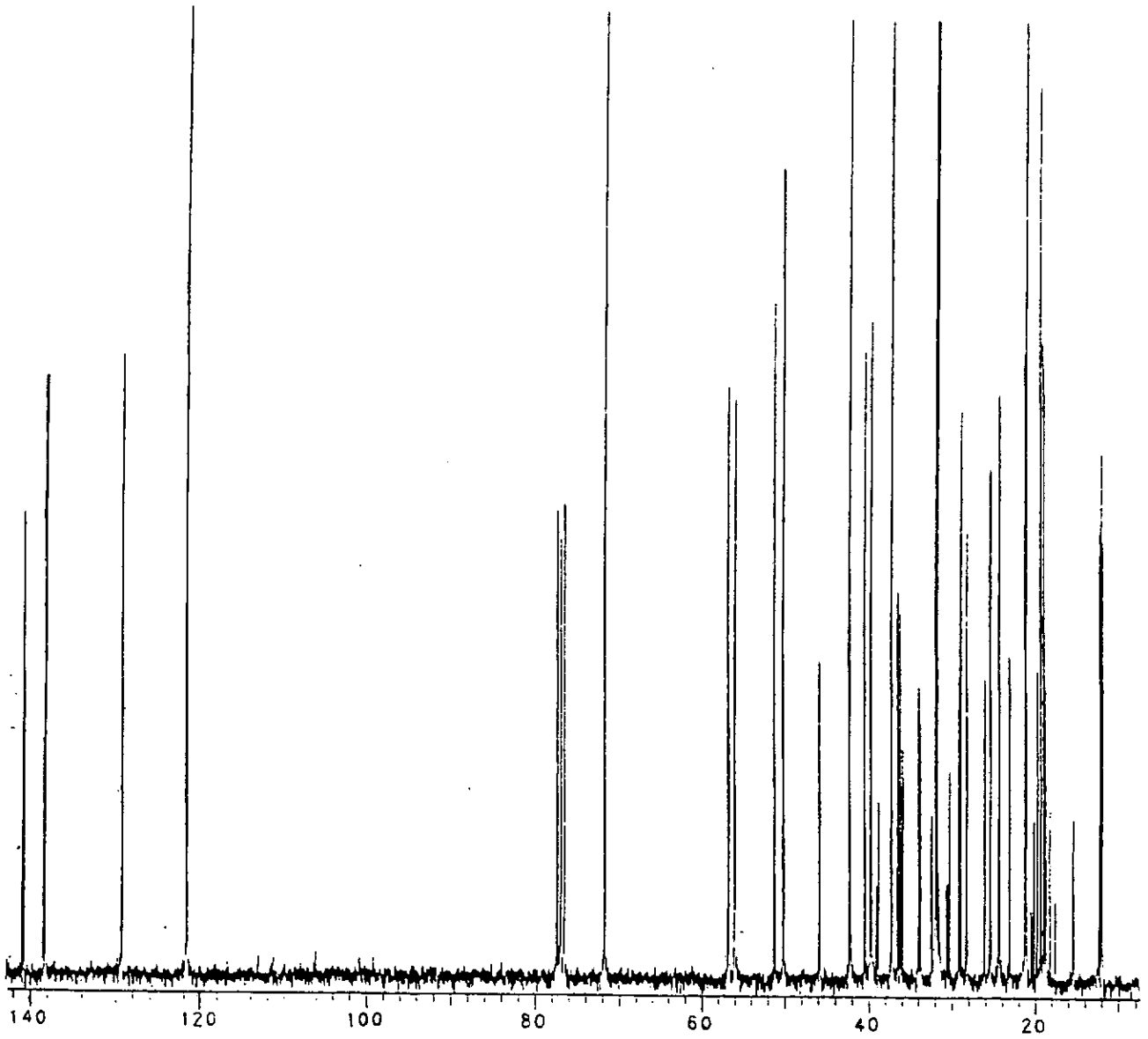
ข. พีคของสาร ค.



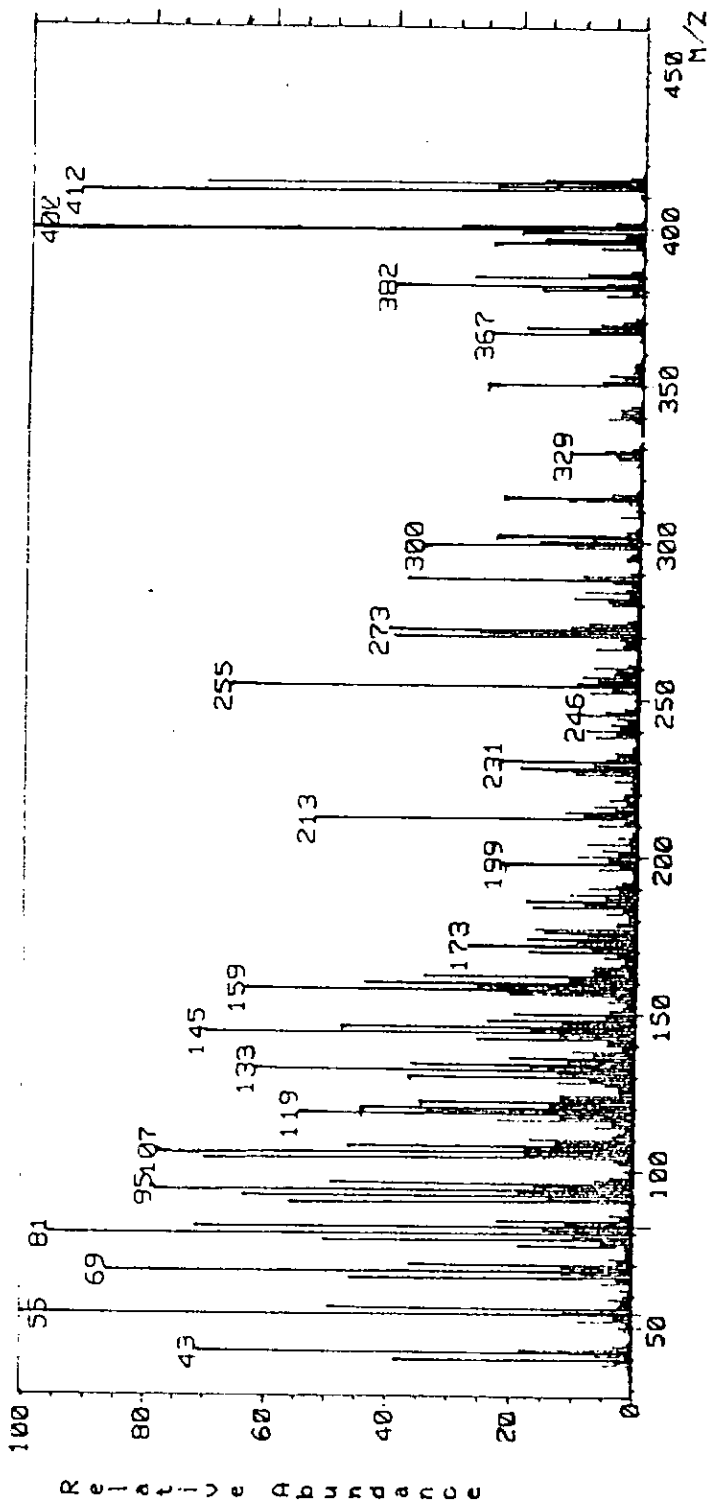
ภาพประกอบ 22 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของสาร ง.



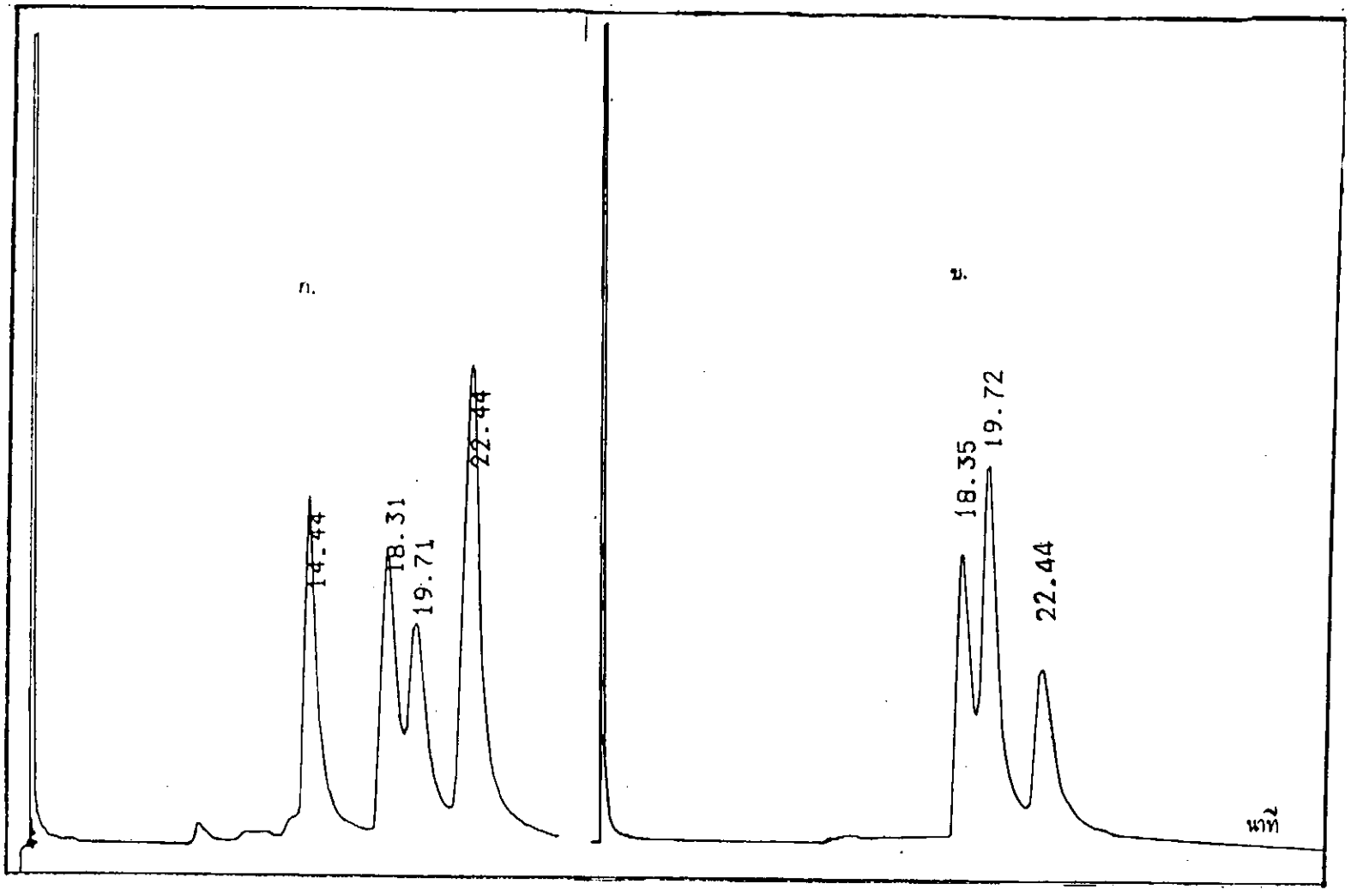
ภาพประกอบ 23 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร ง.



ภาพประกอบ 24 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร ง.



ภาพประกอบ 25 แมสสเปกตรัมของสาร ง.



ภาพประกอบ 26 แก๊สลิควิดโครมาโทแกรมของสาร ง.

ก. พีคของคอเลสเตอรอล แคมเปสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และเบต้า-ไซโตสเตอรอล ตามลำดับ

ข. พีคของสาร ง.

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผล

จากการสกัดสารจากรากพุดน้อยตากแห้งบดละเอียดด้วยเอทานอล แล้วนำผลสกัดด้วยเอทานอลมาทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ พบว่ามีแอลคาลอยด์และสเตอรอยด์ในปริมาณมาก แต่ไม่พบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน เมื่อนำผลสกัดด้วยเอทานอลมาแยกแอลคาลอยด์ได้ผลสกัดสองส่วนคือ ผลสกัดดิบแอลคาลอยด์และผลสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต เมื่อแยกผลสกัดทั้งสองส่วนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ในผลสกัดดิบแอลคาลอยด์พบสาร ก. มีจุดหลอมเหลว 186-188 องศาเซลเซียส คาดว่าสารนี้คือ เบต้า-แอไมรินแอซิเตต ในผลสกัดด้วยเอทิลแอซิเตตพบสาร 2 ชนิด คือ สาร ข. มีจุดหลอมเหลว 216-218 องศาเซลเซียส สารนี้คือ ลูพีออลแอซิเตต และสาร ค. มีจุดหลอมเหลว 134 องศาเซลเซียส เป็นสารผสมของสเตอรอยด์ต่าง ๆ คือเบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล

เมื่อนำผลสกัดด้วยเอทานอลมาสกัดแยกส่วนของสารด้วยคลอโรฟอร์มกับน้ำได้ผลสกัดสองส่วน คือ ผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผลสกัดด้วยน้ำ เมื่อแยกผลสกัดทั้งสองส่วนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ในผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม พบสาร ง. มีจุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์สารพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับสาร ค. ซึ่งเป็นสารผสมของสเตอรอยด์ต่าง ๆ คือ เบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล ส่วนสารที่แยกได้จากผลสกัดด้วยน้ำมีปริมาณน้อยและไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้

อภิปรายผล

ในการทดสอบเบื้องต้นทางเคมีเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ในรากพุดน้อย พบว่ามีแอลคาลอยด์และสเตอรอยด์ในปริมาณมาก จึงนำผลสกัดด้วยเอทานอลของรากพุดน้อยมาแยกแอลคาลอยด์ได้ผลสกัดสองส่วน คือผลสกัดดิบแอลคาลอยด์ และผลสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต ในผลสกัดดิบแอลคาลอยด์ได้สาร ก.มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 186-188 องศาเซลเซียส ให้ผลสีม่วงแดงกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด แสดงว่าเป็นสารประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด [ν_{max} (cm^{-1})] ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน คือ

1730(C=O), 1250 (C-O), 1020(C-O) ^{1}H NMRสเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$)ได้ค่า δ(ppm) 0.88-2.17(-CH, $-CH_2$, $-CH_3$), 2.08 (CH_3-C=O), 4.48(-CH-O), 5.15(-CH=C) แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e ได้ M^+ 468($C_{32}H_{52}O_2$), 408(M^+-$C_2H_4O_2$), 218(M^+ - $C_{16}H_{26}O_2$) และ 203(M^+ - $C_{17}H_{29}O_2$) เนื่องจากสาร ก. มีปริมาณน้อยไม่สารมารถนำมาทดลอบเพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างได้ แต่จาการเปรียบเทียบสเปกตรัมกับเบต้า-แอไมรินแอซีเตต ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_2$ ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด [ν^{KBr}_{max} (cm^{-1})] ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน คือ 1740,1250 ($COOCH_3$) ^{1}H NMR สเปกตรัมได้ค่า δ(ppm) 0.77-1.28(-CH,$-CH_2$,$-CH_3$), 2.03(CH_3-C=O), 4.55(-CH-O), 5.28(-CH=C) (Magalhaes Alves and Arndt. 1966 : 1327-1330) และเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมกับกรด เบต้า-แอซีทิลโอลิโนลิค แสดงค่า m/e M^+ 498 ($C_{32}H_{50}O_4$), 438(M^+-$C_2H_4O_2$), 248(M^+ - $C_{16}H_{26}O_2$) และ 203(M^+ - $C_{17}H_{27}O_4$) (Dahl , Mc Murry and Amenechi. 1966 : 1335-1336) ทำให้คาดว่าสาร ก. คือ เบต้า-แอไมรินแอซีเตต

ในผลสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตได้สารสองชนิด คือ สาร ข. และสาร ค. สาร ข. มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 216-218 องศาเซลเซียส ให้ผลสีม่วงแดงกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด แสดงว่าเป็นสารประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ มีค่า Rf เท่ากับลูพีออลแอซีเตต ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด [ν^{KBr}_{max}(cm^{-1})] ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันคือ 1735(C=O), 1640(CH_3-C=CH_2), 1250 (C-O), 1050(C-O) ^{1}H NMRสเปกตรัมได้ค่า δ(ppm) 0.78-2.35(-CH,$-CH_2$, $-CH_3$), 2.09 (CH_3-C=O), 4.45(-CH-O), 4.55,4.65(CH_2=C) แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/e ได้ M^+ 468($C_{32}H_{52}O_2$), 453(M^+- CH_3) ,408(M^+ - $C_2H_4O_2$), 218(M^+ - $C_{16}H_{26}O_2$) และ 189(M^+ - $C_{18}H_{31}O_2$) สเปกตรัมของสาร ข.ใกล้เคียงกับลูพีออลแอซีเตต (Warinthorn Chavasiri. 1987 : 82) สารนี้มีสูตรโมเลกุลเหมือนกับเบต้า-แอไมรินแอซีเตต ต่างกันที่ลูพีออลแอซีเตต มีค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1640 cm^{-1} และ^{1}H NMR สเปกตรัมได้ค่า δ ที่ 4.55, 4.65 ppm ที่แสดงถึงหมู่ CH_2=C ที่ C_{29}-C_{29} ส่วนเบต้า-แอไมรินแอซีเตต ^{1}H NMR สเปกตรัมได้ค่า δ ที่ 5.15 ppm ที่แสดงถึงหมู่ -CH=C ที่ C_{12}-C_{13} ผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์สาร ข.มีจุดหลอมเหลว 212-214 องศาเซลเซียส ไม่ปรากฏการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ $COOCH_3$ ที่ 1735 และ 1250 cm^{-1} แต่ปรากฏการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3300(OH) และ 1040 (C-O) ^{1}H NMR สเปกตรัมไม่ปรากฏค่า δ ที่ 2.09 (ppm) (CH_3-C=O) ^{13}C NMR สเปกตรัมได้ค่า δ (ppm) 79.01(C-OH),109.32(=CH_2) แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/eได้ M^+ 426($C_{30}H_{50}O$), 218(M^+ - $C_{14}H_{24}O$) ,207(M^+ - $C_{16}H_{27}$) และ189

(M^+-$C_{16}H_{29}O$)ซึ่งใกล้เคียงกับลูพีออล (Warinthorn Chavasiri. 1987 : 83-84) จากข้อมูลที่ได้ดังกล่าว และจากการหาจุดหลอมเหลวผสมกับลูพีออลแอซิเตตทำให้สรุปได้ว่า สาร ข. คือ ลูพีออลแอซิเตต

สาร ค.มีลักษณะเป็น ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 134 องศาเซลเซียส ให้ผลสีเขียวกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด แสดงว่าเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ มีค่า Rf เท่ากับสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอล กับสติกมาสเตอรอล ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด [ν_{max}^{KBr} (cm^{-1})]ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน คือ 3440(O-H), 1650(C=C), 1060(C-O) ^{1}H NMR สเปกตรัม (300 MHz,$CDCl_3$) ได้ค่า δ (ppm) 0.68-2.30(-CH,-CH_2,-CH_3), 3.52 (-CH-OH), 5.09(-HC=CH) และ 5.35(-C=CH) แมสสเปกตรัมแสดงค่า m/eได้ M^+ 414 ($C_{29}H_{50}O$), 412 ($C_{29}H_{48}O$), 400 ($C_{28}H_{48}O$), 396(M^+_{414}-H_2O), 382 (M^+_{400}-H_2O), 300(M^+_{412}-C_8H_{16}), 255(M^+_{412} - $C_{10}H_{21}O$) และ213(M^+_{414}-$C_{13}H_{29}O$) แก๊สลิควิดโครมาโทแกรมแสดงพีค 3 พีค ที่รีเทนชันไทม์ 18.30, 19.67 และ22.37 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับแคมเปสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และเบต้า-ไซโตสเตอรอล ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด และ^{1}H NMRสเปกตรัมของสาร ค.ใกล้เคียงกับของสติกมาเตอรอล แต่จากแมสสเปกตรัมทำให้คาดว่าสาร ค. เป็นสารผสมของเบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมา-สเตอรอล และแคมเปสเตอรอล ซึ่งสารประกอบทั้งสามมีโครงสร้างต่างกันที่ แคมเปสเตอรอลมี -CH_3 ต่อที่ C-24 เบต้า-ไซโตสเตอรอล มี -CH_2CH_3 ต่อที่ C-24 ดังนั้นสารทั้งสองตัวนี้มีค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด และ^{1}H NMRสเปกตรัมเหมือนกัน ส่วนสติกมาสเตอรอลมี 2 พันธะคู่ที่ C_5-C_6 และ C_{22}-C_{23} เบต้า-ไซโตสเตอรอลมี 1 พันธะคู่ที่ C_5-C_6 ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ต่างกันที่สติกมาสเตอรอลแสดงการงอนอกระนาบของ =CH เป็นพีคคู่ที่ 970-960 cm^{-1} เบต้า-ไซโตสเตอรอลแสดงพีคเดี่ยวที่ 960 cm^{-1} ใน ^{1}H NMRสเปกตรัมต่างกันที่สติกมาสเตอรอลแสดงค่า δ ของ -HC=CH- ที่ 5.09 ppm และ-C=CH- ที่ 5.35 ppm เบต้า-ไซโตสเตอรอลแสดงค่า δ ของ-C=CH- เฉพาะที่ 5.35 ppm ดังนั้นถ้ามีสารทั้งสามปนอยู่ ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด และ^{1}H NMRสเปกตรัมจึงเป็นเสมือนของสติกมาสเตอรอลเพียงสารเดียว แต่จากแมสสเปกตรัมที่แสดงค่า m/e ได้ M^+ 414($C_{29}H_{50}O$), 412($C_{29}H_{48}O$) และ400 ($C_{28}H_{48}O$) และจากการยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยแก๊สลิควิดโครมาโทแกรมทำให้สรุปได้ว่าสาร ค. เป็นสารผสมของเบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล

เมื่อนำผลสกัดด้วยเอทานอลมาสกัดแยกส่วนของสารด้วยคลอโรฟอร์มกับน้ำ ได้ผลสกัด 2 ส่วนคือ ผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผลสกัดด้วยน้ำ ในผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มได้สาร ง. มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส ให้ผลสีเขียวกับปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด แสดงว่าเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ มีค่า Rf เท่ากับสาร ค.

และสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอล กับสติกมาสเตอรอล สเปกตรัมและแก๊สลิควิดโครมาโทแกรม ของสาร ง. ใกล้เคียงกับสาร ค. จึงสรุปได้ว่าสาร ง. เป็นสารผสมของเบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เทพ เชียงทอง. "การวิจัยทางเคมีและปัญหาข้อขัดแย้งเกี่ยวกับการวิจัยสมุนไพรไทย," วิทยาศาสตร์. 31(11) : 47-52 ; พฤศจิกายน 2520.

นิทยา ตันติเวชวุฒิกุล. "ประสบการณ์การวิจัยด้านสมุนไพร," ใน การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤษเคมี ครั้งที่ 2. หน้า 99-103. มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523.

สินา ผู้พัฒนพงศ์. สมุนไพร ตอนที่ 2. หน้า 116. กรุงเทพฯ : นิวธรรมดาการพิมพ์, 2522.

เสนาะ บุญมี. อนุกรมวิธานของพืชดอก. หน้า 252. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม : คณะวิทยาศาสตร์, 2523.

เอมอร โสมนะพันธุ์ และนันทวัน บุณยะประภัศร. "สารมัฏฐธิ์ทางเภสัชวิทยาจากพืช," ใน การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤษเคมี ครั้งที่ 2. หน้า 104-150. มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523.

Allam, K. and others. "14-Ketoalstonidine and Other Alkaloidal Constituents of the Stem Bark of Alstonia constricta," Journal of Natural Products. 50(4) : 623-625 ; July/August,1987

Bakana, P. and others. "Stereochemical Consideration in Reletion to the Pharmacological Activity of Pterostaberan Alkaloids," Journal of Natural Products. 48(4) : 766-771 ; September/October, 1985.

Bhattacharyya, J. and M.S.Q. Morais. "5,6-Dimethoxy-7-hydroxy Coumarin (Umckalin) from Allamada blanchetti : Isolation and ^{13}C-NMR Characterisics," Journal of Natural Products. 49(2) : 354-371 ; March/April,1986.

Dahl,T.,T.B.H.Mc Murry and P.I.Amenechi."$^{3}\beta$-Acetyl Oleanolic Acid form Drepanocarpus lunatus," Phytochemistry. 5(6) : 1335-1336 ; July/November,1966

Datta, S.K. and P.C. Datta. "Pharmacognosy of Thevetia peruviana Bark," Journal of Crude Drug Research. 15(3) : 109-124 : Mach, 1977.

Farnsworth, N.K. "Biological and Phytochemical Screening of Plants, Journal of Pharmaceutical Sciences. 55(33) : 245-265 ; March,1966.

Feng, X.Z. and others. "Monomeric Indole Alkaloids from Ervatamia hainanensis," Planta Medica. 44(4) : 212-214 ; April,1982

Gorman, M. and others. "The Alkaloids of Vince rosea (Cantharanthus roseus G.D.). II. Catharanthine, Lochnericine, Vindolinine and Vindoline," Journal of Smerican Pharmaceutical Association Scientific edition. 48 : 256- 257 ; 1959.

Gunasekera, S.P., G.A. Cordell and N.R. Farnsworth. "Anticancer Indole Alkaloids of Ervatamia heyneana, " Phytochemistry. 19(6) : 1213-1218 ; June, 1980.

Magalhaes Alves, H. and V.H. Arndt" Triterpenoids Isolation from Machaerium incorruptibile," Phytochemistry.5(6) : 1327-1330 ; July/November, 1966.

Mukhopadhyay, S. and others. "Anticancer Indole Alkaloids of Rhazya stricta. "Journal of Natural Products. 44(6) : 696-700 ; November/December, 1981.

Natori, S., N. Ikekawa and M. Suzuki. Advances in Natural Products Chemistry. p.341. Tokyo : Kodansha Ltd., 1981.

Neuss N. and others. "Vinca Alkaloids. III. Characterization of Leurosine and Vicaleukoblastine, New Alkaloids from Vinca rosea," Journal of American Chemical Society. 81(5) :4754-4755; September, 1959.

Rahman, T.U. and S. Malik "Isolation of Isovallesiachotamine form Legumes of Rhazya stricta, "Journal of Natural Products. 47(2) : 388-389 ; March/April, 1984.

_____. "Vincadine from Legumes of Rhazya stricta," Journal of Natural Products. 48(1) : 153-154 ; January/February, 1985.

Svoboda, G.H. "alkaloids of Vinca rosea. IX. Extraction and Characterization of Leuroside and Leurocristine," Lloydia. 24 : 173-178 ; 1961.

_____. and others. "Several New Alkaloids from Vinca rosea. I. Leurosine, Vinrosine, Perivine, " Journal of American Pharmaceutical Association Scientifice Edition. 47 : 834 ; 1958.

Tewari, S.N., Sh.P. Harpalani and N. Bhatt. "Separation of Constituents of Cerbera thevetia (yellow oleander) by Thin-Layer Chromatography," Pharmazie. 26(1) : 50; January, 1971.

Warank Boonchuary and W.E. Court. "Alkaloids of Rauwolfia cambodiana from Thailand," Planta Medica. 29 : 201-207 ; February/ June, 1976.

Warinthorn Chavasiri. Chemical Constiturents and Biological, Activities of Rhizophora apiculata Bl. p.553. Thesis for the Master of Science Degree in Chemistry at Chulalongkorn University, 1987.

Zeches, M. and others. "Some New Vallesamine-Type Alkaloids, " Journal of Natural Products. 50(4) : 714-720 ; July/August,1987.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การเตรียมรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบแอลคาลอยด์

1.1 สารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ละลายบิสมัสไนเตรต 8 กรัมในกรดไนตริกเข้มข้น 12 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.2 สารละลายเคร้าท์ (Kraut's reagent) ละลายบิสมัสไนเตรต 8 กรัม ในกรดไนตริกเข้มข้น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.3 สารละลายมาร์ม (Marme's reagent) ละลายแคดเมียมไอโอไดด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของโพแทสเซียมไอโอไดด์ 20 กรัม ในน้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.4 สารละลายเมเยอร์ (Mayer's reagent) ละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์ 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของโพแทสเซียมไอโอไดด์ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.5 สารละลายวอลเลอร์ (Valser's reagent) ละลายเมอร์คิวริคไอโอไดด์ 14 กรัม ในสารละลายของโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.6 สารละลายแวกเนอร์ (Wangner's reagent) ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมไอโอดีน 1.27 กรัม ลงในสารละลายที่เตรียมได้ คนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. การเตรียมรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

2.1 สารละลายเคดด์ (Kedd's reagent) ละลายกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิค 1 กรัมในเมทานอล 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.2 สารละลายเคลเลอร์-คีไลนี (Keller-Kiliani's reagent) เติมกรดแอซิติกบริสุทธิ์ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารละลายเฟอริคคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวเกศริน ชื่อสกุล ทีฆายุ

เกิดวันที่ 12 เดือนกุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2505

สถานที่เกิด อำเภอแหลมงอบ จังหวัดตราด

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 64/44 หมู่บ้านชลบุรีวัฒนานิเวศน์
ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง
จังหวัดชลบุรี 20000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2524 มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนชลราษฎร อำรุง
จังหวัดชลบุรี

พ.ศ.2528 กศ.บ. (เคมี) เกียรตินิยมอันดับ 2
จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน

พ.ศ.2533 กศ.ม. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจากรากนุดน้อย

บทคัดย่อ

ของ

เกศริน ศิมายุ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
เมษายน 2533

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากพุดน้อย โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบสารประกอบ 3 ชนิด คือ เบต้า-แอไมรินแอซิเตต (จุดหลอมเหลว 186-188 องศาเซลเซียส) ลูพิออลแอซิเตต (จุดหลอมเหลว 216-218 องศาเซลเซียส) และสารผสมเบต้า-ไซโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล และแคมเปสเตอรอล (จุดหลอมเหลว 134 , 138-140 องศาเซลเซียส)

A STUDY OF SOME CHEMICAL CONSTITUENTS FROM ROOT OF *Ervatamia microphylla* Kerr.

AN ABSTRACT

BY

KESARIN TEEKAYU

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakarinwirot University
April 1990

Abstract

A study of chemical constituents from root of Ervatamia microphylla Kerr. by chromatography technique and elucidated structural formulae by spectroscopy technique. Three compounds were found to be β - amyrin acetate (m.p. 186 -188 °c), lupeol acetate (m.p. 216 - 218 °c) and a mixture of β - sitosterol, stigmasterol and campesterol (m.p. 134, 138-140 °c).