๔๔.๙๒
ส 16ก
.3

การศึกษาวิธีสกัดและแยกสารธรรมชาติจากส่วนที่เป็นพิษของเมล็ดราชดัด

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ถนนสุขุมวิท ๒๑ ซอยโยธิน กรุงเทพฯ ๑๐ โทร 392-1670, 391-0052

ปริญญานิพนธ์

ของ

สมศักดิ์ ขวัญเมือง

๑๑ ม.ค. 2521

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
กันยายน 2520

332825

67535

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้.

ประธาน

กรรมการ

กันยายน 2520

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีก็ด้วยผู้เขียนได้รับคำแนะนำช่วยเหลือจาก อาจารย์ศศิธร วสุวัต ผู้อำนวยการกองอุตสาหกรรมเภสัช, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย (สวป.) และ อาจารย์วนิดา ตราชู จึงขอกราบขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณประคองศิริ จันทรสมบูรณ์ คุณเปราณี นันทศรี และ คุณพรสวรรค์ ดิษยบุตร แห่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการกองอุตสาหกรรมเภสัช ด้วยดีโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณประทีป ฟูตระกูล และเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเป็นรูปเล่ม

และสุดท้าย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย ที่ได้อนุมัติแบ่งงานส่วนหนึ่งของกองอุตสาหกรรมเภสัช ให้มาดำเนินงานวิจัย เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิตครั้งนี้.

สมศักดิ์ ขวัญเมือง

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	กำจำกัดความศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารสำคัญที่ใช้ประกอบการศึกษาค้นคว้า	6
	การศึกษาค้นคว้าในต่างประเทศ	6
	การศึกษาค้นคว้าในประเทศ	13
3	วิธีดำเนินการทดลอง	17
	การเลือกสารทำละลายต่าง ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ใน Solvent System สำหรับ Run หรือ Elute TLC และ CC	17
	การทดลองใช้ TLC แยกสารส่วนที่เป็นพิษ	17
	การทดลองหาการดูดกลืนแสง UV	20
	การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้จากวิธี TLC	21
	การทดสอบสารที่แยกได้กับ Reagent บางชนิด	21
	การทดลองแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วย Column Chromatography	21
	การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้ด้วย CC	23

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	24
	ตัวทำละลายที่เหมาะสมของ TLC	24
	การตรวจหา Maximum Absorption กับเครื่อง UV Spectrophometer	26
	ปริมาณสารที่แยกได้จากวิธี TLC และ CC	29
	ผลการตรวจสอบกับสารเคมีบางชนิด	29
	อภิปรายผลการทดลอง	30
5	บทย่อ สรุปผล และข้อเสนอแนะ	33
	บรรณานุกรม	
	ภาคผนวก	

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลของสารที่แยกได้จากเมล็ดราชดัดที่แสดงต่อเชื้อบิด *Entamoeba histolytica*	14
2	ผลของพิษของสารต่าง ๆ ที่แยกได้จากเมล็ดราชดัดต่อสัตว์ที่ใช้ทดลอง	15
3	ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้ใน Zone 1 - 4 จากวิธี TLC	25
4	ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้จากวิธี CC	27
5	ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้ด้วยวิธี CC	28

บัญชีภาพประกอบ

รูป		หน้า
1	ผังแสดงภาพ Chromatoplate	19
2	การแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วย Column-Chromatographic Technique	22

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

ประเทศไทยมีพืชสมุนไพรจำนวนมาก ซึ่งบางอย่างเป็นที่รู้จักและรับรองผลทางยาแล้วในวงการแพทย์และเภสัชกรรมแผนปัจจุบัน เช่น ระย่อม มี Alkaloid ที่สำคัญชื่อ Reserpine ใช้รักษาโรคความดันเลือดสูง ใบชาและกาแฟมี Caffeine ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ สะระแหน่ฝรั่ง ซึ่งปลูกได้ในหลายภาคของประเทศ สามารถนำมาแยกผลึก Menthol และน้ำมันสะระแหน่ใช้ในตำรับยาต่าง ๆ ได้ (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2508 : 469 – 470) และยังมีสมุนไพรอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งใช้ได้ผลในการรักษาทางด้านสมุนไพรแผนโบราณ และยังอยู่ระหว่างการศึกษาวิจัยและพิสูจน์ผลทางเภสัชกรรมแผนใหม่ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตยาแผนปัจจุบัน สมุนไพรเหล่านี้ บางชนิดได้มีผู้วิจัยผลทางยาขั้นต้นในห้องปฏิบัติการแล้วว่า มีผลทางเภสัชวิทยาขั้นต้นจริง อาทิ ผักบุ้งทะเล สมุน และราชดัด

ในการเลือกทำงานค้นคว้าครั้งนี้ ได้เลือกสมุนไพรราชดัด (Brucea amarissima) ซึ่งเป็นไม้เล็ก สูงประมาณ 3 เมตร ใบคล้ายสะเดา มีผลกลายเมล็ดมะละกอแห้ง มีมากทางภาคตะวันออก เช่นที่จังหวัดชลบุรีและจันทบุรี แพทย์ชาวจีนใช้เมล็ดราชดัดนี้เป็นยาแก้บิดมาตั้งแต่สมัยโบราณ ส่วนประเทศไทย แพทย์แผนโบราณใช้รากราชดัดต้มรับประทานแก้ไข้แก้บิด แก้เสียดท้อง

จากการวิจัยผลขั้นต้นเกี่ยวกับสารที่สกัดได้จากเมล็ดราชดัดของ ศศิธร วสุวัต กับคณะ ค.ศ. 1973 พบว่ามีสารแสดงฤทธิ์ (Active Substance) กับสารส่วนที่เป็นพิษ (Toxic Substance) ผลการทดลองทางด้านเภสัชวิทยา พบว่าสารส่วนที่เป็นพิษถึงแม้จะสามารถฆ่าเชื้อบิด (Entamoeba histolytica) ได้ดีกว่าสารส่วนแสดงฤทธิ์ แต่ความเป็นพิษสูงกว่ามาก (Sasithorn Wasuwat 1973 : 7 – 8) จากการติดต่อขอทราบข้อมูลเป็นส่วนตัวได้ทราบว่า สวป. ทำการศึกษาขั้นต้นพบว่า สารส่วนที่เป็นพิษไม่ใช่สาร-

บริสุทธิ์ มีส่วนประกอบปนกันอยู่หลายตัว ศศิธร วสุวัต แห่งกองอุตสาหกรรมเภสัช ได้แยกผลึก[1] บางส่วนออกมาได้บางตัวแล้ว แต่ยังมิได้ทำการศึกษาคุณภาพทางยา ปริมาณ และส่วนประกอบโดยละเอียดครบถ้วน จึงเห็นควรจะทำการศึกษาหาวิธีแยกสารต่าง ๆ ในส่วนที่เป็นพิษออกจากกันและกันให้ได้มากที่สุด เพื่อว่าอาจจะพบสารที่เป็นประโยชน์ทางยาตกค้างอยู่ในสารส่วนที่เป็นพิษนี้ได้ และผลงานนี้จะทำให้ได้ข้อมูลซึ่งเป็นรายละเอียดขั้นมูลฐานทางด้านการแยกสกัดสารต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยยา และจะส่งผลในทางส่งเสริมอุตสาหกรรมผลิตยาในประเทศต่อไปในอนาคต

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้</u>

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีที่เหมาะสมในการแยกสารธรรมชาติ (Natural Products) ต่าง ๆ ซึ่งมีอยู่ในสารส่วนที่เป็นพิษ (Toxic Fraction or Toxic Substance) ของเมล็ดราชดัด ซึ่งปรากฏตามรายงานของ Sasithorn Wasuwat et al, ASRCT, Bangkok 1973.

2. ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและกายภาพของสารต่าง ๆ ที่แยกได้ เช่น

   - การดูดกลืนแสง UV (UV Absorption Maxima)
   - การทดสอบสารที่แยกได้กับ Reagent บางชนิด

<u>ความสำคัญของการศึกษาครั้งนี้</u>

1. ทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจในกรรมวิธีและเทคนิคต่าง ๆ ขั้นพื้นฐานในการแยกสารบางอย่าง ซึ่งอยู่ปนกันในพืชได้กว้างขวางขึ้น

2. ผลงานนี้จะช่วยทำให้สามารถแยกสารต่าง ๆ ที่ปะปนกันอยู่ในสมุนไพรราชดัดบางส่วน ซึ่งเป็นที่สนใจศึกษาอยู่แล้วในวงการยาได้

---

[1] ลักษณะผลึก รูปเข็ม – สีขาว เรืองแสงต่อ UV Light, UV Absorption Maxima ประมาณ 280, 258 และ 210 nm. เมื่อใช้ Benzene, Ethylacetate และ Ethanol เป็นตัวทำละลายตามลำดับ.

3. สามารถนำความรู้และประสบการจากการวิจัยนี้ ดัดแปลงนำไปใช้ในการวิจัยแยกสารธรรมชาติจากพืชต่าง ๆ ได้

4. ผลงานที่สามารถแยกสารต่าง ๆ ได้ปะปนกันอยู่ในสารส่วนที่เป็นพิษของราชดัดนี้ จะนำไปสู่การวิจัยค้นคว้าทางด้านเภสัชวิทยาให้ดำเนินไปได้รวดเร็ว ก่อให้เกิดประโยชน์และแนวทางในการศึกษาคุณสมบัติทางยาได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ในการวิจัยค้นคว้าครั้งนี้ จะทำการแยกสารธรรมชาติ (Natural Products) จากสารส่วนที่เป็นพิษ (Toxic Substance) ซึ่งเป็นการวิจัยต่อจากผลการวิจัยตามรายงานของ Sasithorn Wasuwat et al 1973 ที่ได้จากเมล็ดของสบุนไพรราชดัด (Sasithorn Wasuwat, 1973 : 1 - 14) โดยได้รับความอนุเคราะห์สารส่วนที่เป็นพิษ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์ แห่งประเทศไทย (Applied Scientific Research Corporation of Thailand) ทั้งนี้ โดยมุ่งหวังว่าผลงานอาจจะนำไปสู่การแยกสารที่อาจจะเป็นประโยชน์ทางยาหลงเหลือปะปนอยู่กับส่วนที่เป็นพิษบ้างหรือไม่

2. ในการวิจัยเพื่อค้นคว้าหาวิธีแยกสาร จะใช้วิธีการ Chromatography แบบ Thin-Layer Chromatography (TLC) และ Column Chromatography (CC)

3. ศึกษาเกี่ยวกับ

– คุณภาพวิเคราะห์ ทำการตรวจคุณสมบัติของสารที่แยกได้ด้วย UV Spectrophotometer, ตรวจหาค่า R_f และตรวจคุณสมบัติทางด้านปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ

– ปริมาณวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณสารที่แยกได้

การวิจัยครั้งนี้ทำในช่วงระยะเวลาเดือนมีนาคม 2529 – สิงหาคม 2529

คำจำกัดความศัพท์เฉพาะ

1. ราชดัด (Ratchadat) ชื่อต้นไม้ชนิดหนึ่ง ใช้ทำยา (ราชบัณฑิตสถาน, 2513 : 772) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ Brucea amarissima (Lour) Merr. Family SIMARUBACEAE เป็นต้นไม้พุ่ม ใบจักคล้ายใบสะเดา แต่จักหยาบและลึกกว่า ออกดอกเป็นช่อเล็ก ๆ มีผลคล้ายเมล็ดมะละกอเมื่อแก่มีสีดำ บางต้นอาจสูงได้ถึง 3 เมตร มีขึ้นตาม–

ที่ราบดินปนทราย ชื่อเรียกอย่างอื่นอีก เช่น กะดัด ดีคน ไม้ดัก กาจับหลัก พยาคาบหัก (จันทบุรี) โคเซียมจี (จีน) (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2508 : 469 – 470)

2. สารส่วนที่เป็นพิษ (Toxic Fraction or Toxic Substance) หมายถึง สารส่วนที่มีความเป็นพิษสูง สกัดได้จากเมล็ดราชดัด ตามรายงานของ ศศิธร วสุวัต และคณะ

3. สารผสมหรือของผสม (Mixture) หมายถึงสารหลาย ๆ ชนิดที่อยู่ปะปนกัน และในการวิจัยครั้งนี้ให้หมายถึงสารส่วนที่เป็นพิษเท่านั้น

4. สมุนไพร หมายถึงยาที่ได้จากพฤกษชาติ สัตว์หรือแร่ ซึ่งยังมิได้ผสม ปรุง หรือแปรสภาพ

5. ยา หมายถึงของกินหรือทา สำหรับบำบัดโรค หรือบรรเทาความเจ็บปวด (ราชบัณฑิตสถาน, 2513 : 739)

6. โรคบิด (Dysentery) คือโรคที่มีอาการถ่ายอุจจาระบ่อย ๆ ปวดท้อง เป็นชุกชุมในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศไทยเป็นกันมากแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เกิดจากเชื้อบิดต่าง ๆ คือ

Bacillus dysenteriae, Shiga

Bacillus dysenteriae, Flexner

Entamoeda histolytica.

7. Chromatography หมายถึงขบวนการแยกสารออกจากสารผสม โดยอาศัยหลักการแพร่ของสารในตัวทำละลายต่างชนิดกันจะไปได้เท่ากัน และสารจะถูกดูดซับ (adsorb) ได้ไม่เท่ากัน เพราะฉะนั้นเมื่อสารผสม (Mobile Phase or Moving Phase) ไหลผ่านตัวกลาง (Stationary Phase) ที่เหมาะสม สารต่าง ๆ ในส่วนผสมจะเคลื่อนตัวไปด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถแยกสารออกจากกันได้ (Erwing, 1969 : 492)

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ Chromatography แบบ

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Column Chromatography (CC)

8. Thin-Lager Chromatography (TLC) คือขบวนการ Chromatography ที่ใช้ตัวดูดซับ (Adsorbent) บางชนิด (เช่น Alumina G., Cellulose, Silica Gel G. หรือ Kieselguhr G. ฯลฯ) เคลือบหรือฉาบเป็นผิวบาง ๆ บน Supporter แล้วให้ตัวชะ (Eluents) เคลื่อนที่ผ่านไป จากคุณสมบัติที่สารต่าง ๆ ถูกดูดซับและแพร่กระจายตัวในตัวทำละลายต่าง ๆ ได้ไม่เท่ากัน ทำให้สามารถแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันได้ (Dick, 1973 : 621)

9. Column Chromatography คือขบวนการ Chromatography ที่ให้สารที่เป็นตัวดูดซับ (Adsorbent) บรรจุอยู่ใน Column เมื่อเทสารผสมลงไปแล้ว Develop ด้วยตัวชะ (Eluent) ก็จะสามารถแยกสารออกจากกันได้ โดยอาศัยหลักการแบบเดียวกับข้อ 7

10. ตัวดูดซับ (Adsorbent) หมายถึงสารเคมีต่าง ๆ เช่น Alumina, Cellulose, Silica Gel หรือ Kieselguhr ฯลฯ ซึ่งใช้ในขบวนการ Chromatographic Technique ทำหน้าที่เป็นสารเพื่อการดูดเกาะของสารเคมีชนิดอื่น ๆ ที่จะนำมาแยกออกจากสารผสม

11. R_f หมายถึงค่าคงที่ ซึ่งแสดงคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารเคมีแต่ละชนิดในตัวทำละลายตัวหนึ่งตัวใดที่ใช้ใน Chromatographic Technique ได้จากอัตราส่วนของระยะทางที่สารและตัวชะเคลื่อนที่ไป ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

12. Concentration คือวิธีการทำให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น อาจทำโดยใช้ความร้อนขับตัวทำละลายให้ระเหยออกไปพร้อมกับลดความดันหรือไม่ก็ได้ ในการวิจัยครั้งนี้ใช้เครื่องกลั่นแบบลดความดัน Rotavapor - R ของ Buchi Ltd. ประเทศสวิส-เซอร์แลนด์

บทที่ 2

เอกสารสำคัญที่ใช้ประกอบการศึกษาค้นคว้า

เมล็ดราชดัด ปรากฏตามหลักฐานว่าชาวจีนรู้จักนำมาใช้รักษาโรคบิดกันมานานแล้ว (Sasithorn, Wasuwat, 1973 : 2) ตั้งแต่ ค.ศ. 1765 นับตั้งแต่โบราณมาถึงปัจจุบัน มีนักวิทยาศาสตร์ทำการทดลองค้นคว้ามากมาย ทั้งในประเทศและนอกประเทศ อาทิ

1. การศึกษาค้นคว้าในต่างประเทศ

1.1 ค.ศ. 1949 Chen-Yu-Sang ชาวจีน ทำการสกัดสาร Ya-tan-tzu จากพืช Brucellin ด้วย 96 % เมททานอล แล้วระเหย นำที่เหลือไปละลายในน้ำเดือด แล้วกรอง นำสิ่งที่กรองได้มาสกัดด้วย Carbontetrachloride แยกจางด้วยผงถ่าน ตกตะกอนกับ Lead Acetate แล้วให้ทำปฏิกริยากับ Hydrogen Sulfide เพื่อทำลาย Pb^{2+} ที่เหลือ กรอง ระเหยให้แห้ง จะได้ผงสารสีขาว Ya-tan-tzu. ซึ่งเป็นสารพวก Glucoside น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 332 สลายตัวที่ 140° C ค่า Specific Rotation, $[\alpha]_D^{30}$ ประมาณ − 39.7° จากการทดลองพบว่าสารนี้ฆ่าเชื้อบิดได้ (Chen-Ya-Sang, 1949 : 620)

1.2 Jen-Hung Chu แพทย์ชาวจีน ในปี ค.ศ. 1950 ทำการแยกสะกัดสารจากต้น Koo-Sheng-Tse (Brucea Javanica) ได้สารออกมา 3 ชนิด คือ (Jen-Hung Chu, 1950 : 459)

สารที่ 1 สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{16}O_5$ จุดหลอมเหลวประมาณ 263 − 265° C ค่า Specific Rotation $[\alpha]_D^{25}$ เท่ากับ − 35°

สารที่ 2 สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}O_5$ จุดหลอมเหลวประมาณ 254 − 256° C ค่า Specific Rotation, $[\alpha]_D^{25}$ เท่ากับ − 60°

สารที่ 3 สูตรโมเลกุล $C_{17}H_{34}O_2$ จุดหลอมเหลวประมาณ 60 − 61° C เป็นสารพวกกรดไขมัน

จากรายงานยืนยันผลการทดลองว่า สารที่ 1 สามารถฆ่าเชื้อบิด (Amoebic) และเชื้อมาเลเรียได้

1.3 ปี ค.ศ. 1959 Chien-Li Huang (Huang, 1959 : 105 - 111) แห่งมหาวิทยาลัยแมรี่แลนด์ เมือง Baltimore ทำการศึกษาสาร 3 ชนิด ที่แยกสกัดได้จากเมล็ดราชดัด แล้วทดลองฉีดเข้าไปในหนู ผลปรากฏว่าได้ค่าเฉลี่ยของขนาดความเป็นพิษ (Medium Lethal Dosage หรือ MD_{50}) ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (ของจำนวนสัตว์ทั้งหมด) โดยคิดหน่วยเป็นมิลลิกรัมของวัตถุเป็นพิษต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมของตัวสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

สาร A (Glucoside) ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 7.4 มก./ก.ก.

สาร B (Glucoside) ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 10.0 มก./ก.ก.

สาร C (Phenolic) ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 0.65 มก./ก.ก.

และเมื่อทำการทดลองโดยเปลี่ยนจากหนูเป็นกระต่าย ผลปรากฏดังนี้

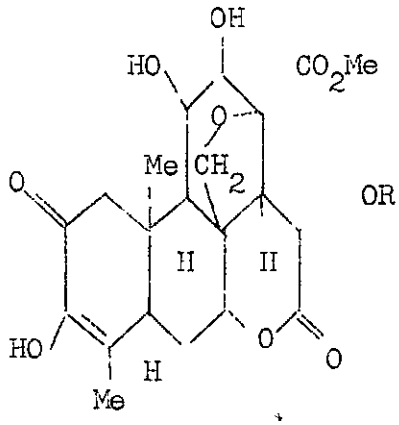
สาร A ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 10.0 มก./ก.ก.

สาร B ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 10.0 มก./ก.ก.

สาร C ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 5.0 มก./ก.ก.

ผลการทดลองพบว่า สาร A และ B ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจของหนูและกระต่ายลดลง กล้ามเนื้อไม่ทำงาน กล้ามเนื้อหัวใจทำงานอ่อนลง (Cardiac Depression) ผลสุดท้ายระบบหายใจไม่ทำงาน สาร C มีผลเช่นเดียวกับสาร A และ B แต่ในระยะเริ่มแรกหลังจากทดลองฉีดเข้าไป ความดันเลือดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และหลังจากนั้นจะลดต่ำลงกว่าปรกติ

*ปี ค.ศ. 1967 Polonsky, et al (Polongsky, 1967 : 424 - 426) แห่งฝรั่งเศส ทำการแยกสกัดเมล็ดราชดัด ได้ผลึกสารออกมา 4 ชนิด ซึ่งเรียกรวม ๆ กันว่า สาร Bruceine มีสูตรโครงสร้างดังนี้



จากการวิเคราะห์โครงสร้างสารทางเคมีและอาศัยเครื่อง NMR, UV, IR Spectrometer ปรากฏผลว่า

Brucaine A R คือ $COCH_2Pr$ (Pr = Isopropyl) $[\alpha]_D^{25} = -86.3^\circ$

Brucaine B R คือ Acetate $[\alpha]_D^{25} = -77.2^\circ$

Brucaine C R คือ $COCH = CMe\ C(OH)Me_2$ $[\alpha]_D^{25} = -34.2^\circ$

(Me = Methyl, group)

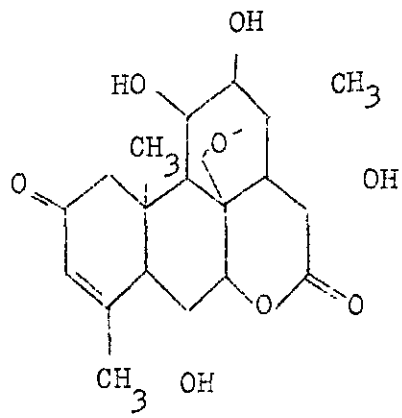
Brucaine D ไม่มีรายงานผลการทดลอง

เมื่อนำสาร Brucaine A, B และ C มาไฮโดรไลส์ในเบส ปรากฏว่าสารทั้งสามให้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกัน มีโครงสร้างเช่นเดิม แต่หมู่ R เปลี่ยนเป็น H และค่า $[\alpha]_D^{25}$ เท่ากับ -95.4°

ต่อมาในปี ค.ศ. 1968 Polongsky กับคณะ ได้ทำการศึกษา Brucaine ที่แยกสกัดได้จากเมล็ดราชดัด และพบ Brucaine ชนิด D และ E มีจุดหลอมเหลว 285 – 290 และ 260 – 264°C กับมีค่า Specific Rotation เท่ากับ – 21. และ + 25° ตามลำดับ (Polongsky, 1968 : 1346 - 1349)

Duncan และ Henderson แห่งมหาวิทยาลัย Toronto ในปี ค.ศ. 1968 ทำการแยกสกัดเมล็ด Brucea sumatrana ด้วย 50 % เอทธานอล

กับ Chloroform-Ethanol (3 : 2 โดยปริมาตร) ปรากฏว่าได้สาร Bruceine 2 ชนิด คือ D และ G Bruceine G. มีสูตรโครงสร้างดังนี้



จุดหลอมเหลว ประมาณ 254 – 258 °C, Specific Rotation เท่ากับ + 38.9° สามารถเกิด Triacetate ได้ ซึ่งมีจุดหลอมเหลว 243 – 248 °C, Specific Rotation เท่ากับ + 89.0 (Duncan, 1968 : 768 - 769)

✕ 1.4 Geissman, et al แห่งมหาวิทยาลัยคาลิฟอร์เนีย (Geissman, 1966 : 205 – 208) นำเอาเมล็ดของ Brucea sumatrana มาทำการแยกสกัดในปี ค.ศ. 1966 ด้วย Petroleum Ether กับ เมทธานอล แล้วระเหย ปรากฏว่าได้สารเป็นยางเหนียว ๆ สีน้ำตาล เมื่อนำมาแยกอีกครั้งด้วย Thin-Layer Chromatography โดยใช้ Silica Gel G. เป็นตัวดูดซับ (Adsorbent) ปรากฏว่าได้สาร 3 ชนิด เมื่อพ่น (Spray) กรดซัลฟุริคเข้มข้นลงบน Plate จะกลายเป็นจุดสีน้ำเงิน และสารนี้มีรสขมมาก

แต่เมื่อทดลองนาเมล็ดของ Brucea sumatrana ไปทำการแยกสกัดด้วย Hexane เพื่อให้ไขมันหายไป ปรากฏว่าผลที่ได้เป็นสารที่ไม่มีรสขม และไม่ให้สีกับ conc. H_2SO_4 แต่เมื่อสกัดต่อไปอีกด้วย Methylene Chloride ปรากฏว่าสารที่ได้มีรสขม และให้สีน้ำเงินกับ conc. H_2SO_4 อีก (บน Thin-Layer Chromatography)

จากการทดลอง Geissman กับคณะ พบว่าในการสกัดด้วย Hexane จะได้น้ำมันของพืชชนิดนี้ออกมา 37.8 กิโลกรัม (จากเมล็ด 40 กิโลกรัม) และเมื่อนำ–

น้ำมันชนิดนี้มาทำการตกผลึกซ้ำ (Recrystallization) ด้วย เมทธานอล และเอทธานอล ตามลำดับ จะได้สารอีกชนิดหนึ่ง Geissman กับคณะตั้งชื่อสารตัวนี้ว่า Brusatol คุณสมบัติทั่วไปดังนี้

สูตรโมเลกุล $C_{25}H_{34}O_{11}$

จุดหลอมเหลว ประมาณ 254 – 256° C

$[\alpha]_D^{26}$ + 43.6°

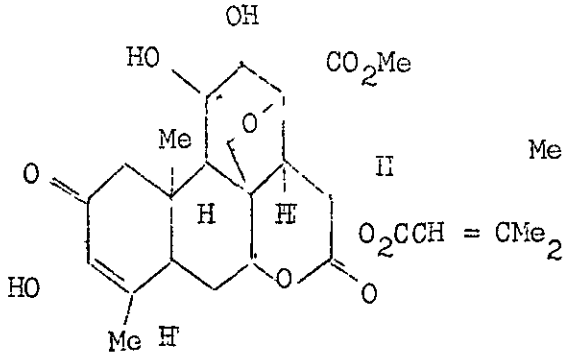
มีรสขม ให้สีเขียวกับ $FeCl_3$ เมื่อทำปฏิกริยากับ 2, 4 – dinitrophenyl hydrazine รสจะขมขึ้น

กับ UV ให้ค่า λ_{max} 219 และ 279 nm. และค่า Wave Number 1730 และ 1670 cm^{-1} ตามลำดับ

จากการศึกษาทดลองพบว่า โครงสร้างของ Brusatol ประกอบด้วยหมู่ Methoxy, ($-OCH_3$) และมี Quaternary-Methyl 1 หมู่ กับมี Allylic Methyl อยู่ 2 หมู่ และยังสามารถทำปฏิกริยากับกรดอาซิติกได้สารประกอบประเภท Mono และ Triacetate ได้

ปี ก.ศ. 1968 Sim. et el แห่งมหาวิทยาลัยคาลิฟอร์เนีย ทำการแยกสกัดผลึก Brusatol ได้จากพืชชนิดเดียวกัน ในการสกัดใช้ เมทธานอล แล้วระเหยน้ำสารที่เหลือมาเติมน้ำ แล้วนำไปกรอง น้ำสารละลายที่กรองได้ไปสกัดต่อด้วย Hexane และ Methylene Chloride จะได้สาร Brusatol (Sim, 1968 : 429 – 431) และจากการศึกษาคุณสมบัติ พบว่ามีสูตรโครงสร้างเป็นดังนี้

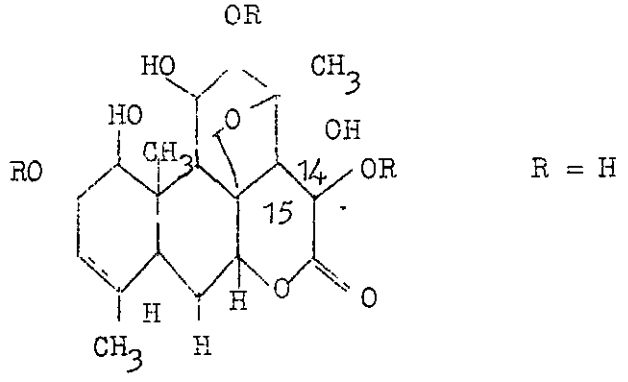
Brusatol



Me = Methyl group.

เมื่อทำการ Hydrogenate Brusatol จะได้สารประกอบ Dihydro-busatol และเมื่อทำการ Hydrolyse ต่อไป จะได้กรด Senecioic

ในปี ค.ศ. 1968 Stocklin และ Geissman แห่งมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย ทำการแยกสกัดสารประเภท Non-Lipophilic จากเมล็ดของ Brucea sumatrana พบว่าได้สารประกอบประเภท Lactone มีสูตรโครงสร้างดังนี้



จุดหลอมเหลวประมาณ 258 – 258.5° C, Specific Rotation + 21.1° C ให้สีม่วงกับ con. H_2SO_4 นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกริยาเกิดสารประกอบ Acetate ได้ ทั้งนี้โดยการแทนที่หมู่ที่ตำแหน่ง R เมื่อนำสาร Acetate ที่ได้นี้ไปทำปฏิกริยาต่อไปกับ $SOCl_2$- C_5H_5N จะได้สาร Anhydro-tetraacetate เกิด Double Bond ที่ตำแหน่ง 14, 15 โดยมีจุดหลอมเหลวระหว่าง 245 – 246° C และสูตรโมเลกุลเป็น $C_{28}H_{34}O_{12}$ (Stocklin, 1967 : 6007 - 6010)

ปี ค.ศ. 1971 Chen แห่งไต้หวัน (Chen, 1971 : 223 - 229 ทำการสกัดเมล็ด Brucea sumatrana ด้วยคลอโรฟอร์ม ได้สาร Brusatol ที่มีรสขม สูตรโมเลกุล $C_{26}H_{32}O_{11}$ จากการศึกษาพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับสาร Brusetol ที่ Sim กับคณะสกัดได้ในปี ค.ศ. 1968 และเมื่อให้สารนี้ทำปฏิกริยากับ Sodium methoxide จะได้สาร Bruceolide ($C_{12}H_{26}O_{11}$)

1.5 Kupchan, et al (Kupchan, 1975 : 648 - 654)

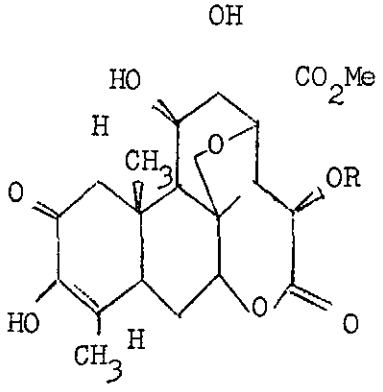
ปี ค.ศ. 1975 แห่งมหาวิทยาลัยเวอร์จิเนีย ทำการสกัดเมล็ด Brucea antidysenterica ได้สาร 2 ชนิด คือ

(1) Bruceantin (R คือ $COCH = CMe\ CHMe_2$)

(2) Bruceantinol (R คือ $COCH = CMe\ CMe_2OH$)

Me = Methyl group

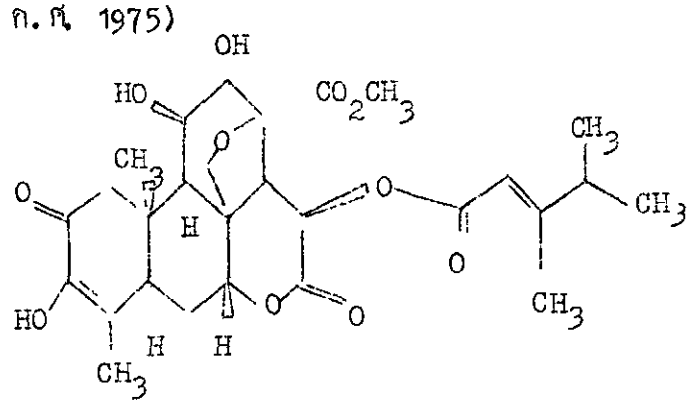
สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารทั้งสอง คือ



และจากการทดลองพบว่าสารทั้งสองนี้มีคุณสมบัติในทางทำลายเม็ดเลือดขาว (Antileukemia)

ในปีเดียวกัน Kupchan ทำการสกัดเปลือกต้นไม้ชนิดนี้ (Brucea antidysenterica) โดยใช้ 95 % เอทธานอล ตามด้วยคลอโรฟอร์ม, 10 % เมทธานอล และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ตามลำดับ แล้วนำไปแยกด้วย Chromatography โดยใช้ Silica Gel เป็น Adsorbent ปรากฏว่าได้สาร Bruceantin เช่นเดียวกัน จากการทดลองใน หนู กระต่าย และเซลของคนที่เป็นโรค Leukemia พบว่าใช้สารนี้ปริมาณน้อยมาก (15 – 3000 ไมโครกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง) ก็สามารถบำบัดโรคดังกล่าวได้

1.6 ปี ก.ศ. 1976 Liao, et al (Liao, 1976 : 167 - 176) ทำการวิจัยเกี่ยวกับสาร Bruceantin (ที่ Kupchan สกัดได้จาก Brucea antidysenterica ในปี ก.ศ. 1975)



Bruceantin

พบว่ามีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Tumor) โดยทำการทดลองในกระต่าย สารนี้จำนวน 0.1 mM สามารถทำลาย Polyribosome ได้ แสดงว่าการยับยั้งอาการของโรคนี้ ก็คือการยับยั้งการสร้างโปรตีน และถ้าใช้สารนี้มากกว่า 1.0 mM ขึ้นไป ก็จะมีผลไปยับยั้งขบวนการสร้าง Peptide Bond ในขบวนการสังเคราะห์โปรตีน

Liao กับคณะ สรุปผลการทดลองว่า Side Chain ของสาร Bruceantin มีส่วนสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก หรือยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนนั่นเอง

2. การศึกษาค้นคว้าในประเทศ

ปี ก.ศ. 1973 Sasithorn, et al (Sasithorn Wasuwat, 1975 : 1 - 14) แห่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์ แห่งประเทศไทย ทำการสกัดเมล็ดราชดัดด้วย Petroleum Ether โดยแช่ใน Methanol ก่อนเพื่อสกัดไขมันที่ไม่ต้องการออก แยกเมทธานอลออกโดยการกลั่นแบบลดความดัน เติมน้ำลงไปเท่าตัว เข้าเครื่องเหวี่ยงให้ตกตะกอน เอาสารละลายส่วนบนมาสกัดด้วย Methylene chloride แล้วระเหยให้แห้ง และนำมาแยกโดยใช้ Column Chromatography ซึ่งมี Silica Gel GF 254 เป็นตัวดูดซับ (Adsorbent) Elute ด้วย Ethyl acetate, 95 % เอทธานอล และน้ำกลั่น แล้วใช้เครื่อง UV ตรวจส่วนต่าง ๆ ของสาร (Fraction) ที่แยกได้

ผลการวิจัย ดังนี้

(1) ส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ จัดแบ่งตามคุณสมบัติได้ 3 พวกใหญ่ ๆ คือ

- ส่วนที่แสดงฤทธิ์ (Active Fraction)
- ส่วนที่เป็นพิษ (Toxic Fraction)
- ส่วนที่ไม่แสดงฤทธิ์และไม่เป็นพิษ (Inert Fraction)

และส่วนอื่น ๆ อีก ที่มีความสำคัญรองลงไป

(2) ส่วนที่แสดงฤทธิ์ ได้จากการใช้ 95 % เอทธานอลเป็นตัว Elute ให้ UV Absorption Maximum ที่ 222 nm ผลการทดลองปรากฏว่าสามารถทำลายเชื้อบิด Entamoeba histolytica ใน In Vitro ได้ ดังแสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 ผลของสารที่แยกได้จากเมล็ดราชดัดที่แสดงต่อเชื้อบิด Entamoeba histolytica

สาร	คุณสมบัติที่แสดงต่อเชื้อบิด	ปริมาณ mg./cm^3 ที่มีผลเทียบเท่ายาฉีด *2-dehydroemetine dihydrochloride 0.8 mg/cm^3	หมายเหตุ
ส่วนที่แสดงฤทธิ์	ทำลายเชื้อบิด	1.3	
ส่วนที่เป็นพิษ	ทำลายเชื้อบิด	0.25	เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง
ส่วนที่ไม่แสดงฤทธิ์และไม่เป็นพิษ	ไม่ทำลาย	–	

*2-dehydroemetine dihydrochloride คือยาฉีดรักษาโรคบิดของ Roche

(3) ส่วนที่เป็นพิษ ได้จากการ Elute ด้วย Ethyl Acetate ให้ UV Absorptism Maxima ที่ 260 และ 280 nm แม้จะสามารถทำลายเชื้อบิดได้ดี แต่ความเป็นพิษสูงเกินกว่าที่จะนำมาใช้เป็นยาได้ ดังแสดงไว้ในตาราง 1 และ 2

ตาราง 2 ผลของพิษของสารต่าง ๆ ที่แยกได้จากเมล็ดราชดัด ต่อสัตว์ที่ใช้ทดลอง (หนู)

สาร	ปริมาณสารที่ใช้ (mg/kg ของน้ำหนักสัตว์ทดลอง)	จำนวนสัตว์ทดลองที่ตายใน 3 วัน	หมายเหตุ
ส่วนที่แสดงฤทธิ์	280	3	
	200	1	
	100	0	
ส่วนที่เป็นพิษ	10	3	
	5	0	
	2.5	0	
2-dehydroemetine	100	3	
dihydrochloride	66.7	2	
(2-DEDC)	44.4	0	

(4) จากการทดลองกับหนู ปรากฏว่าค่า LD_{50} ของสารต่าง ๆ ดังนี้

สาร	LD_{50} (mg/kg)
ส่วนที่แสดงฤทธิ์	184.4
ส่วนที่เป็นพิษ	7.119
ยาฉีด 2-dehydroemetine dihydrochloride	59.82

(5) ส่วนไม่แสดงฤทธิ์ และไม่เป็นพิษ (Inert Fraction) ได้จากการ Elute Column ด้วยน้ำกลั่น และเป็นส่วนที่ไม่มีผลต่อการทำลายเชื้อบิด ดังแสดงไว้ในตาราง 1

จากข้อมูลที่กล่าวมาในตาราง 1 แสดงว่าสารส่วนที่เป็นพิษ จำนวนเล็กน้อย 0.25 mg/cm^3 มีค่าเทียบเท่ากับ 0.8 mg/cm^3 ของยาฉีดรักษาโรคบิด 2-dehydroemetine dihydrochloride ส่วนสารส่วนแสดงฤทธิ์ (Active Fraction) ต้องใช้ถึง 1.3 mg/cm^3 จึงจะมีผลเท่าเทียมกัน แต่สารส่วนที่มีพิษ มีอันตรายต่อสัตว์ทดลองสูง (ตาราง 2) ปริมาณเพียง 10 mg/kg สามารถทำให้หนูตายถึง 3 ตัว ในเวลา 3 วัน ขณะเดียวกันกับที่สารส่วนแสดงฤทธิ์และยาฉีด 2-DEDC ต้องใช้ถึง 280 และ 100 mg/kg

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

ในการวิจัยทำการทดลองที่อุณหภูมิประมาณ 25 – 26° C เว้นแต่จะกำหนดเป็นกรณีไป ทำการทดลองตามลำดับขั้นดังนี้

1. การเลือกสารทำละลายต่าง ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ใน Solvent System สำหรับ Run หรือ Elute TLC และ GC.

ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ซึ่งมีลำดับของ Polarity จากน้อยไปหามาก 8 ชนิด ดังต่อไปนี้

n-Hexane

Cyclohexane

Carbontetrachloride

Benzene

Chloroform

Diethyl ether

Ethyl acetate

Ethanol

โดยทดลองผสมสารละลายเหล่านั้นในอัตราส่วนต่าง ๆ เกิดเป็น Solvent System 10 ชนิด (ดังปรากฏในภาคผนวก ตาราง 2)

2. การทดลองใช้ Thin-Layer Chromatography แยกสารสีน้ำเงิน

2.1 การเตรียม Plate ซึ่ง Silica Gel G. 40 กรัม ผสมกับน้ำ 80 กรัม (หรือ 80 cm^3) คนให้ทั่วให้มีลักษณะเละ (Slurry) แล้วบรรจุในเครื่อง–

ทำ Plate (Desaga, Heidelberg) เพื่อฉาบลงบนแผ่นแก้วขนาด 20 x 20 cm โดยกำหนดความหนาของ Adsorbent เท่ากับ 0.25 mm. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 – 30 นาที เพื่อให้น้ำระเหยออกไปแล้วนำเข้าตู้อบ (Oven) ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง

2.2 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองแยกด้วย Thin-Layer Chromatography นำตัวทำละลายจากข้อ 1 ที่สามารถละลายสารส่วนที่เป็นพิษ และรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้ มาผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ในการทดลองครั้งนี้ได้เตรียมไว้ 10 System โดยกำหนดให้มีคุณสมบัติในการชะแยกต่างกัน (ดูตาราง 2 ภาคผนวก)

หยดสารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษเข้มข้น 1.04 % (ละลายใน Ethyl acetate) ลงไปบน Plate ให้เป็นจุด (Spot) ปล่อยให้แห้ง นำไปแยก (Run) ในโหลที่บรรจุตัวทำละลาย (Solvent System) ชนิดต่าง ๆ ไว้โหลละ 150 cm^3 รวม 10 ใบ

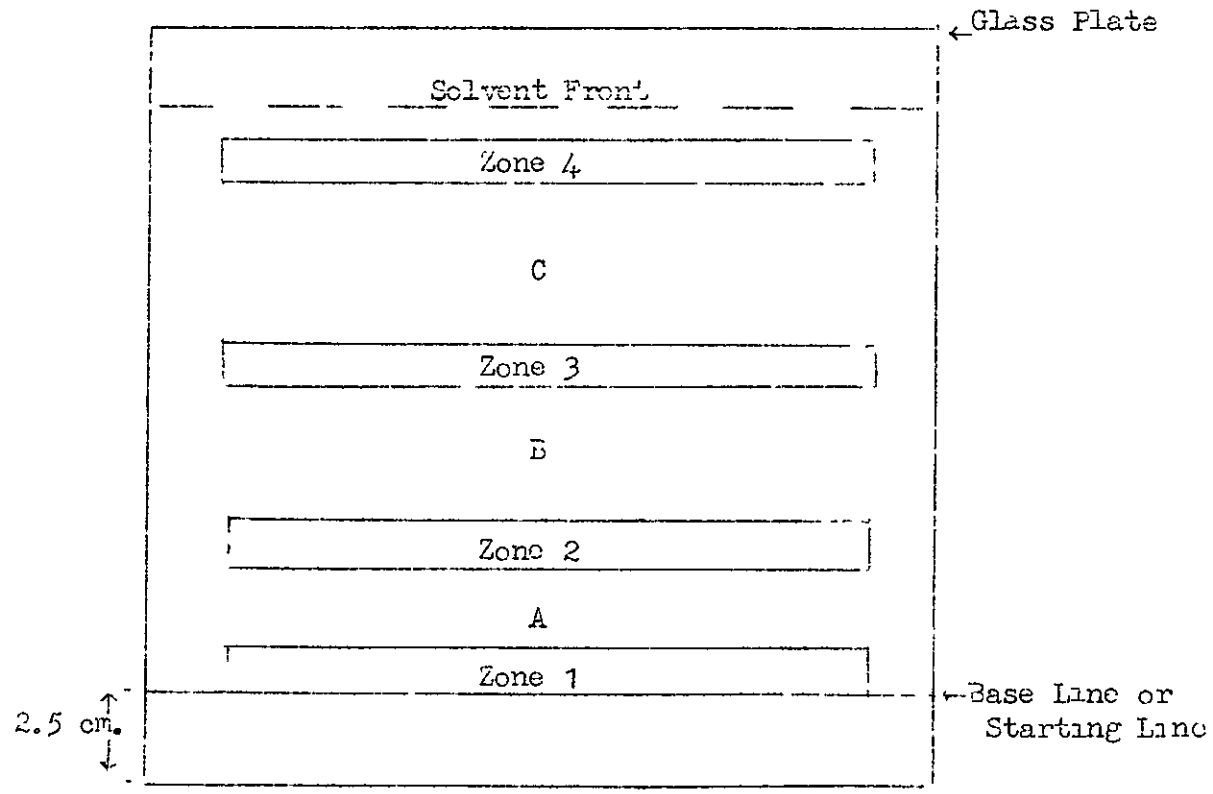
เมื่อปล่อยให้ตัวทำละลายแพร่ซึมผ่าน Plate (Run) ขึ้นไปเป็นระยะทางตามต้องการแล้ว (15 cm) นำ Plate ออกจากโหล ทำให้แห้ง นำไปตรวจสอบกับ UV Light ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น Detecting (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

เปลี่ยน Plate ที่ฉาบด้วย Silica Gel G เป็น Plate ที่ฉาบด้วย Alumina G. หยดสารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษที่เข้มข้นเท่ากันลงไปบน Plate ให้เป็นจุด นำไปแยกในโหล แล้วตรวจสอบกับ UV Light ทำนองเดียวกัน (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

จากการทดลองพบว่า Solvent System 4 และ 9 แยกสารส่วนที่เป็นพิษได้ 2 และ 4 สาร ตามลำดับ และ Plate ที่ฉาบด้วย Silica Gel G. แยกได้ดีกว่า Plate ที่ฉาบด้วย Alumina G. ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป จึงใช้ Plate ที่ฉาบด้วย Silica Gel G. และตัวทำละลายใช้ Solvent System 9 คือ Benzene : Ethyl acetate . Ethanol = 3 : 2 : 1 v/v

หยดสารละลาย 0.2 cm^3 ของสารส่วนที่เป็นพิษ (ใน Ethyl acetate) เข้มข้น 8.3, 4.15, 2.07 และ 1.04 % ลงบน Plate 4 ตำแหน่งตามลำดับ โดยหยดลงไปหลาย ๆ หยด ให้ติดต่อกันเป็นแถบ (Strip) ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปแยกในไหลที่มี Solvent System 9 อยู่ 150 cm^3 แล้วนำไปตรวจภายใต้ UV Light เพื่อตรวจแถบสารที่แยกได้ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ดังรูป 1 แล้วคำนวณหาค่า R_f ของ Zone 1 - 4

รูป 1 พังแสดงภาพ Chromatoplate



หมายเหตุ

1. การทำลองทุกครั้งระยะทางจาก Base Line ถึง Solvent Front เท่ากับ 15 cm. และ Base Line อยู่ห่างจากขอบล่างสุดของ Plate 2.5 cm.

2. Zone 1 - 4 คือแถบสารที่แยกได้และเรืองแสง (สีต่าง ๆ) เมื่อตรวจสอบด้วย UV Light

3. A, B และ C คือ Area ระหว่าง Zone 1 - 2, 2 - 3 และ 3 - 4 ตามลำดับ ซึ่งไม่เรืองแสงเมื่อตรวจสอบด้วย UV Light

จากการทดลองพบว่า Plate ที่หยดด้วยสารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษเข้มข้น 4.15 % แยกได้ชัดเจน ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจะใช้สารละลายที่เข้มข้น 4.15 %

นำ Plate ที่แยกด้วยสารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษเข้มข้น 4.15 % ที่แยกไว้แล้ว มาทำการขูด Zone 1 - 4 มาแต่ละ Zone บรรจุลง Column Chromatography แล้วชะด้วย 95 % Ethanol, Ethanol : Water = 1 : 1 v/v และน้ำ ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่าน Column เพื่อนำไปตรวจสอบกับเครื่อง UV Spectrophotometer

ขั้นตอนการนี้ต้องทำ Blank ด้วย โดยใช้ Plate ที่เกลือบด้วย (Silica Gel G. ที่หยดด้วย Ethyl acetate 0.2 cm^3 มา Run ในโหลใบเดียวกับการทดลองข้างต้น ขูดแต่ละแถบที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับ Zone 1 - 4 นำไปชะใน Column ด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เช่นเดียวกัน เก็บสารละลายที่ผ่าน Column เพื่อใช้เป็น Blank Controlling Sample ใน UV Spectrophotometer (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

Area A, B และ C ขูดมาทำการแยกทำนองเดียวกัน และทำ Blank ด้วยเช่นกัน

3. <u>การทดลองหาการดูดกลืนแสง UV</u>

ตั้งเครื่อง (Warm) UV Spectrophotometer ก่อนการทดลองประมาณ 15 นาที นำสารละลาย (หรือ Sample) แต่ละชนิดที่ผ่าน Column แล้ว (ในข้อ 3) มาทำการตรวจสอบกับเครื่อง Spectrophotometer บันทึก UV Absorption Maxima ระหว่าง 320 - 200 nm. ไว้

ฝ่ายหนังสือสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ถนนสุขุมวิท ๒๓ ซอยโยธินพัฒนา กรุงเทพฯ ๑๐ โทร ๒๕๒๑๘๗๘, ๒๕๑๐๘๕๐

4. การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้จากวิธี TLC

ขูด Zone 1 - 4 และ Area A, B และ C ที่แยกได้บน Plate ด้วยวิธี TLC ซึ่งหยดด้วย 4.15 % ของสารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษ จำนวน 0.2 cm^3 มาใส่ลงในแต่ละ Column ชะด้วย 95 % Ethanol 10 cm^3 เก็บสารละลายที่ผ่าน Column ทำให้เข้มข้นโดยการนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเข้า Thermostat Vacuum Oven ที่อุณหภูมิ 55 °C เปิด Vacuum ที่ 633 mm Hg เป็นเวลาประมาณ 4 - 6 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักสารที่ได้ คำนวณหา Percentage Yield ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย

5. การทดสอบสารที่แยกได้กับสารเคมี (Reagent) บางชนิด

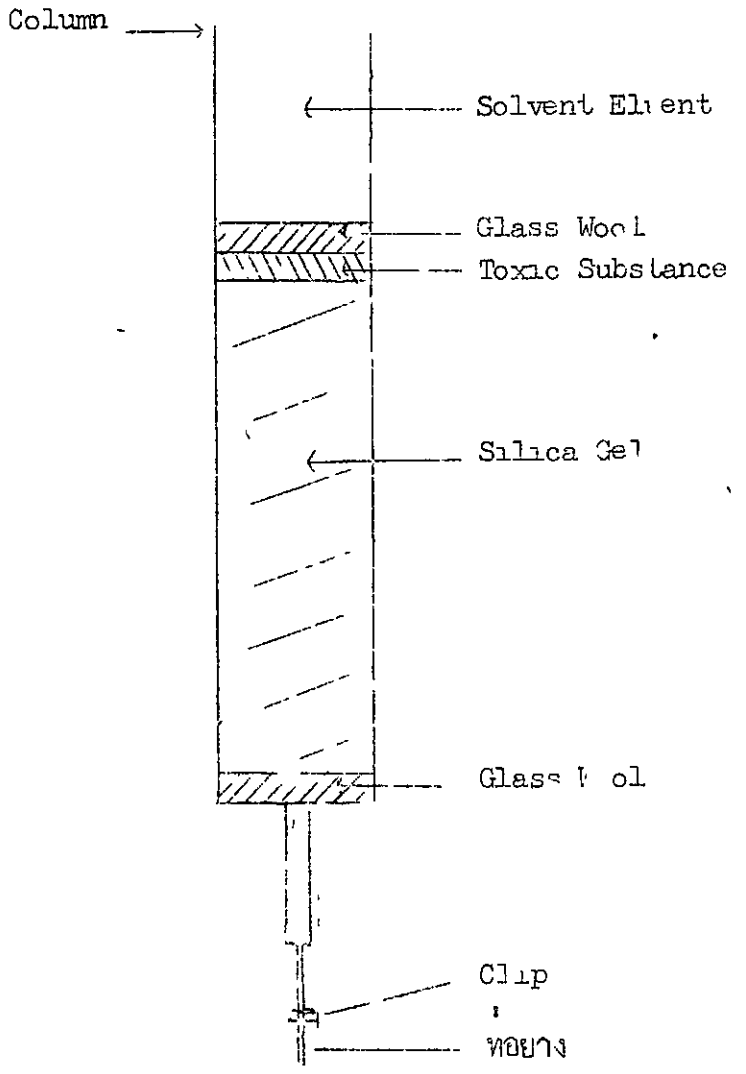
นำ Plate ที่แยกแล้วจากข้อ 2 มาพ่น (Spray) ด้วยสารละลาย Ferric Chloride 10 % (ในน้ำและใน Ethanol ตามลำดับ), 5 % Phosphomolybic acid (ใน Ethanol), Folin-Ciocalteu's Reagent และ Dragendorff's Reagent ตามลำดับ (รายละเอียดส่วนผสมและวิธีใช้ในภาคผนวก)

6. การทดลองแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วย Column Chromatography

ชั่งสารส่วนที่เป็นพิษ (Toxic Substance) ตามต้องการ (ประมาณ 0.8420 กรัม) ละลายใน Ethylacetate ในจำนวนน้อยที่สุด แล้วผสมกับ Silica Gel จำนวนน้อยพอที่จะดูดสารละลายได้ อบไล่ Ethyl acetate ให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบรรจุลง Column (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3 cm ยาว 40 cm ใช้ Silica Gel เป็น Adsorbent โดยบรรจุไว้ประมาณ 3 ใน 4 ของความยาวของ Column ดังรูป 2

67535

รูป 2 การแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วย Column Chromatographic Techsique



ใช้ Benzene, Ethyl acetate และ 95 % Ethanol เป็นตัวชะ (Eluent) ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่าน Column ไว้ใน Erlemeyer Flask ประมาณขวดละ 50 – 75 cm^3 นำไปตรวจด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer Peak จะค่อย ๆ เริ่มขึ้นสูงในขวดแรก ๆ แล้วลดน้อยลงจนกระทั่งหายไป บันทึกความยาวคลื่นที่ Peak ขึ้นสูงสุดไว้ แล้วเปลี่ยนตัวชะตามลำดับ (ในการทดลองเก็บไว้ 148 ขวด)

7. การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้ด้วยวิธี Column Chromatography

นำสารละลายที่ผ่าน Column ชนิดเดียวกันและเป็นสารที่ดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นเดียวกันมาทำให้เข้มข้นโดยกลั่นแบบลดความกัน (ใช้เครื่อง Rotavapor-R) นำเข้าตู้อบ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55° C ทำให้แห้งอีกครั้งหนึ่งใน Thermostat Vacuum Oven ที่อุณหภูมิ 55° C เปิด Vacuum ที่ 633 mm. Hg. เมื่อน้ำหนักสารคงที่ให้บันทึกไว้ คำนวณหา Percentage Yield ของสารแต่ละชนิด (ที่ดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน)

ในการทดลอง ทำ Column Chromatography ซ้ำอีก 2 ครั้ง แต่เปลี่ยนเป็นใช้สารส่วนที่เป็นน้ำหนัก 1.1155 และ 0.6252 กรัม ตามลำดับ ดำเนินการทดลองแบบเดียวกัน

นำสารแต่ละชนิดที่แยกเก็บไว้ในแต่ละขวดไม่ปะปนกัน ไปทำการทดลองแยกต่อด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบชนิดสารที่แยกได้ในส่วน (Fraction) ต่าง ๆ และหาค่า R_f

บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสามารถใช้ TLC และ CC Technique แยกสารที่ปนกันอยู่ในสารส่วนที่เป็นพิษของเมล็ดราชดัดได้ ขั้นตอนที่สำคัญคือการทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสม (Solvent System) เพื่อใช้ในการแยกสารส่วนที่เป็นพิษ และการหาปริมาณสารที่แยกได้

ผลการทดลองดังนี้

<u>ตัวทำละลาย (Solvent System) ที่เหมาะสมของ TLC</u>

ผลการทดลองพบว่า Solvent System 9 (Benzene : Ethyl acetate : Ethanol = 3 : 2 : 1 v/v) แยกสารส่วนที่เป็นพิษได้ 4 ชนิด (ดูตาราง 2 ภาคผนวก) และ Plate ที่เคลือบด้วย Silica Gel G. แยกได้ดีกว่า Plate ที่เคลือบด้วย Alumina G.

เมื่อทำการ Run TLC หลาย ๆ Plate โดยใช้ Solvent System 9 Plate เคลือบด้วย Silica Gel G. หยดด้วยสารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษเข้มข้น 4.15 % คำนวณค่า R_f เฉลี่ยของ Zone 1 - 4 ได้ 0, 0.27, 0.59, และ 0.93 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 3

ตาราง 3 ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้ใน Zone 1 – 4 จากวิธี Thin-Layer Chromatogrophy

Zone	R_f	% Yield	UV Absorption Maxima (nm.)	การทดสอบกับ Reagent					สีภายใต้ UV Light
				$FeCl_3$ 10%	$FeCl_3$ 10%(al)	Phospho-molybdic acid 5% (al)	Folin Ciocalteu	Dragendorff	
1	0	7.22	230 – 220	-	-	-	-	-	เหลือง – น้ำตาล
2	0.27	8.43	250	-	-	-	+	-	ขาว – เหลือง
3	0.59	12.04	280	-	-	-	-	-	ขาว
4	0.93	31.32	280	-	-	-	-	+	เขียวอ่อน
		59.02							

การตรวจหา Maximum Absorption กับเครื่อง UV Spectrophotometer

เมื่อนำสารละลาย (หรือ Sample) ที่ผ่านการแยกด้วยวิธี TLC และชะล้าง (Wash) จาก Column แล้ว ไปตรวจสอบการดูดกลืนแสง UV (บทที่ 3 ข้อ 3.2) ผลปรากฏว่าสารละลายของ Zone 1 - 4 ที่ชะด้วย 95 % Ethanol ให้ Absorption Maxima ชัดเจนที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันที่ 230 – 220, 250, 280 และ 280 nm ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 3

(ส่วน Area A, B และ C ปรากฏว่าไม่ใช่ Peak ของสาร เพราะปรากฏผลที่ได้เช่นเดียวกับ Blank Controlling Plate หลังจากนี้การศึกษาต่าง ๆ จึงทำกับสารที่ได้จาก Zone 1 - 4 เท่านั้น)

เมื่อทำการแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วยวิธี Column Chromatography โดยใช้ Benzene, Ethyl acetate และ 95 % Ethanol เป็นตัวชะตามลำดับ (บทที่ 3 ข้อ 6) แล้วนำสารละลายที่ผ่าน Column ไปตรวจสอบกับเครื่อง UV Spectrophotometer พบว่าอย่างน้อยมีสารที่แยกออกมาได้ 3 ชนิด และให้ UV Absorption Maxima Sharp Peak ที่ 280, 258 และ 210 mn. ตามลำดับ (ดูตาราง 4)

ตาราง 4 ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้จากวิธี Column Chromatography

สาร	ตัวชะ	% Yield	Uv Absorption Maxima (nm)	สีกับ UV Light	หมายเหตุ
1	Benzene	17.14	280	ขาว	ตรงกับรายงานของ Sasithorn
2*	Ethylacetate	34.44	258	เหลืองอ่อน	ใกล้เคียงกับรายงานของ Sasithorn
3**	Ethanol	29.56	210	น้ำตาล	-
		81.14			

* เมื่อนำไปแยกต่อด้วยวิธี Thin- yer Chromatography พบว่ามีสารที่มีค่า 0.27, 0.59 และ 0.93 เท่ากับค่า R_f ของสารใน Zone 2, 3 และ 4

** เมื่อนำไปแยกต่อด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography พบว่ามีสารที่มีค่า R_f 0 และ 0.27 ซึ่งเท่ากับค่า R_f ของสารใน Zone 1 และ 2

การทดลองนี้พบว่าถ้าแยกเก็บสารที่ได้แต่ละขวดไม่ปะปนกัน พร้อมกับหาค่า R_f ของสารที่แยกได้ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography พบว่าสารที่แยกได้ด้วยวิธี Column Chromatography มี 4 ชนิด และมีค่า UV Absorption Maxima ที่ความยาวกลื่น 280, 280, 250 และ 210 nm. และมีค่า R_f เท่ากับ 0.93, 0.59, 0.27 และ 0 ซึ่งเท่ากับค่า R_f ของสารใน Zone 4, 3, 2 และ 1 ตามลำดับ (ดูตาราง 5)

ตาราง 5 ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้ด้วยวิธี Column Chromatography

สาร	ตัวทำละลาย	% Yield	UV Absorption Maxima (nm)	TLC* R_f	สีกับ UV Light	หมายเหตุ
1	Benzene	36.32	280	0.93	เขียวอ่อน	
2	Ethyl acetate	20.43	280	0.59	ขาว	
3	Ethyl acetate	11.64	250	0.27	ขาว–เหลือง	
4	Ethamol	11.75	210	0	เหลือง–น้ำตาล	
		80.14				

*ผลนี้ได้จากการตรวจสอบยืนยันโดยนำส่วนที่แยกได้จาก Column ไปตรวจสอบด้วย TLC เพื่อเปรียบเทียบผล

ปริมาณสารที่แยกได้จากวิธี Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography

ก. วิธี Thin-Layer Chromatography ในการทดลองใช้สารละลายของสารส่วนที่เป็นพิษเข้มข้น 4.15 % หยดลงบน Plate 3 แผ่น ๆ ละ 0.2 cm^3 ภายหลังจากนำไป Run TLC ขูดแต่ละแถบนำไปชะล้าง (Wash) ใน Column นำสารละลายที่ได้เข้าตู้อบ (บทที่ 3 ข้อ 4) ผลปรากฏ Percentage Yield ของสารที่แยกได้ของ Zone 1 – 4 รวมกันแล้วได้ประมาณ 59 ดังแสดงไว้ในตาราง 3

ข. วิธี Column Chromatography ผลการทดลองพบว่า Percentage Yield ของสารที่แยกได้มีค่าเฉลี่ย 17.14 เมื่อใช้ Benzene เป็นตัวชะ และมีค่า 34.44 กับ 29.56 เมื่อใช้ Ethyl acetate และ 95 % Ethanol เป็นตัวชะตามลำดับ เมื่อคิดเป็น Percentage Yield ทั้งหมดจะมีค่าประมาณ 81 ดังแสดงไว้ในตาราง 4

จากการทดลองแยกสารด้วยวิธี Column Chromatography พบว่า ถ้าหากแยกสารแต่ละส่วนที่ได้แต่ละขวดไปปะปนกันจะได้สาร 4 ชนิด กล่าวคือเมื่อนำสารที่ได้จาก Column ไปทดลองแยกต่อด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography พบว่าสารที่ชะด้วย Benzene มีค่า R_f 0.93 เท่ากับสารใน Zone 4 สารที่ชะด้วย Etlyl acetate มีค่า R_f 0.27, 0.59 และ 0.93 ซึ่งเท่ากับค่า R_f ของสารใน Zone 2, 3 และ 4 และสารที่ชะด้วย 95 % Ethanol มีค่า R_f 0 ซึ่งเท่ากับค่า R_f ของสารใน Zone เพราะฉะนั้น การทดลองแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วยวิธี Column Chromatography จึงสามารถแยกสารได้ 4 สาร ซึ่งให้ผลตรงกับวิธี Thin-Layer Chromatography เช่นกัน และจากการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่แยกได้ พบว่ามีค่า Percentage Yield ทั้งหมดประมาณ 80 ดังแสดงไว้ในตาราง 5

ผลการตรวจสอบกับสารเคมี (Reagent) บางชนิด

จากการนำ Plate TLC ที่แยกไว้แล้วมาตรวจสอบหา Phenolic Compound กับสารละลาย Ferric Chloride 10 %, . Alcoholic Ferric Chloride 10 %, .

Phosphomolybdic acid 5 % (al), Folin-Ciocalteu's Reagent และตรวจหา Alkaloid ด้วย Dragendorff's Reagent (บทที่ 3 ข้อ 5) ผลปรากฏดังแสดงไว้ในตาราง 3 กล่าวคือ

– Zone ต่าง ๆ ไม่ให้ปฏิกริยากับสารละลาย Ferric Chloride ทั้ง 2 ชนิด และไม่ให้ปฏิกริยากับสารละลาย Phosphomolybdic acid

– Zone 2 เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าให้ผลต่อ Folin – Ciocalteu's Reagent.

– Zone 4 เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้ม แสดงว่าให้ผลต่อ Dragendorff's Reagent.

Zone อื่น ๆ นอกจากนี้ไม่ให้ผลต่อ Reagents.

<u>อภิปรายผลการทดลอง</u>

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาหาวิธีแยกสารต่าง ๆ ออกจากสารส่วนที่เป็นพิษของเมล็ดราชดัด พบว่า

1. วิธี Chromatography เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการแยกได้ โดยเฉพาะวิธี Thin-Layer Chromatrgraphy และวิธี Column Chromatography ในการทดลองนี้พบว่า Plate ที่เคลือบด้วย Silica Gel G. แยกได้ดีกว่า Plate ที่เคลือบด้วย Alumina G.

2. เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการแยกของทั้ง 2 วิธี พบว่าวิธี Thin-Layer Chromatography แยกสารออกมาได้ 4 ชนิด และวิธี Column Chromatography ในการทดลองนี้แยกสารออกมาได้ 4 ชนิด เช่นเดียวกัน แต่วิธี TLC สามารถทำได้รวดเร็วและใช้สารในการตรวจน้อยกว่ามาก

3. สารที่แยกได้ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography Zone 1 – 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0, 0.27, 0.59 และ 0.93 ตามลำดับ และให้ UV Adsorption Maxima ที่ความยาวคลื่น 130 – 220, 250, 280 และ 280 nm ตามลำดับ . Percentage Yield ทั้งหมดของสารที่แยกได้ประมาณ 59 (ตาราง 3)

4. สารที่แยกได้ด้วยวิธี Column Chromatography เมื่อใช้ Benzene, Ethyl acetate และ 95 % Ethanol เป็นตัวชะตามลำดับ พบว่ามี UV Absorption Maxima ที่ความยาวคลื่น 280, 258 และ 210 nm. ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบสารที่ได้ต่อไปด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography พบว่ามีสารที่มีค่า R_f 0.93, 0.59, 0.27 และ 0 ซึ่งเท่ากับค่า R_f ของสารใน Zone 4, 3, 2 และ 1 ตามลำดับ และ Percentage Yield ทั้งหมดของสารที่แยกได้ประมาณ 80 (ตาราง 5)

5. ในการทำการทดลองนี้พบว่าวิธี Thin-Layer Chromatography เป็นวิธีที่ Sensitive มาก จะต้องควบคุม (Control) สิ่งแวดล้อมให้อยู่ใกล้เคียงในภาวะเดิมเสมอทุก ๆ การทดลอง เช่น

- อุณหภูมิ
- ความชื้น
- Plate หนาสม่ำเสมอและเตรียมไว้ใหม่ ๆ
- Reagent ที่ใช้ผสมเป็นสารละลาย ควรเตรียมใหม่ ๆ

นอกจากนี้การแยกด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography เพื่อให้ได้ Zone ต่าง ๆ ชัดเจนแยกจากกันดี จะต้องระมัดระวังในสิ่งต่อไปนี้

ก. ความเข้มข้น (Concentration) ของสารละลายที่จะหยดประมาณ 4.15 %

ข. ปริมาณ (Amount) สารละลายที่จะหยดบน Plate TLC ไม่ควรเกิน 0.2 cm^3

และควรทำการทดลองซ้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยจึงจะดี

6. การแยกด้วยวิธี Column Chromatography ควรปล่อยให้สารละลาย (หรือตัวชะ) ไหลลงมาช้า ๆ สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง หมั่นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบกับเครื่อง UV Spectrophotometer โดยเฉพาะเมื่อสารใดสารหนึ่งที่ไหลแยกออกมาใกล้จะหมด มิฉะนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนตัวชะสารจะปะปนกันได้ และการแยกจะดีหรือไม่ดียังขึ้นกับการบรรจุ Adsorbent ลง Column

7. การที่สารที่แยกได้จากวิธี Thin-Layer Chromatography และวิธี Column Chromatography มี Percentage Yield แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากตัวดูดซับ (Adsorbent) ที่ใช้ วิธี TLC ใช้ Silica Gel G เขียนตัวชะ ส่วนวิธี CC ใช้ Silica Gel เป็นตัวชะ Silica Gel G มี Gypsum เป็นส่วนผสม ดังนั้น Silica Gel G น่าจะดูดซับสารได้ได้มากกว่า Silica Gel ทำให้ปริมาณสารหรือ Percentage Yield ที่ได้จาก 2 วิธีนี้แตกต่างกัน.

8. การแยกด้วยวิธี Column Chromatography สามารถใช้สารเริ่มต้นได้มากกว่าวิธี Thin-Layer Chromatography ดังนั้นปริมาณสารที่แยกได้จึงมีปริมาณมาก แต่วิธี Column Chromatography สิ้นเปลืองตัวทำละลายหรือตัวชะมากกว่าวิธี Thin-Laye Chromatography และใช้เวลานานกว่ามาก

9. ผลการตรวจสอบสารที่แยกได้กับสารเคมี (Reagent) บางชนิด พบว่าสารใน Zone 2 และ 4 ให้ปฏิกริยาต่อ Folin-Ciocalteu's Reagent และ Dragendorff's Reagent ตามลำดับ ดังนั้นสารใน Zone 2 และ 4 น่าจะเป็นสาร Phenolic Compound และ Alkaloid แต่ทั้งนี้จะยืนยันผลได้แน่นอนได้ก็ต่อเมื่อได้ทำการทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติด้านอื่น ๆ อย่างละเอียดถี่ถ้วนแล้วเท่านั้น.

บทที่ 5

บทย่อ สรุปผล และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายในการวิจัย

เพื่อหาวิธีการเหมาะสมในการแยกสารต่าง ๆ ที่รวมกันอยู่ในสารส่วนที่เป็นพิษ โดยใช้ Chromatographic Technique (TLC, CC)

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำการแยกสารส่วนที่เป็นพิษด้วยวิธีการ

   Thin-Layer Chromatography (TLC)

   Column Chromatography (CC)

2. ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและกายภาพของสารต่าง ๆ ที่แยกได้ เช่น
   - การดูดกลืนแสง UV (UV Absorption)
   - ค่า R_f
   - การทดสอบสารที่แยกได้กับสารเคมี (Reagents) บางชนิด
3. วิเคราะห์หาปริมาณสารที่แยกได้จากวิธี Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography

สรุปผล

1. ทำการแยกสารออกจากสารส่วนที่เป็นพิษด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography ได้อย่างน้อยวิธีละ 4 สาร
2. สารที่แยกได้ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography มีค่า R_f เท่ากับ 0, 0.27, 0.59 และ 0.93 และมีค่า UV Absorption Maxima ที่ความยาวคลื่น 230 – 220, 250, 280 และ 280 nm. ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า เมื่อใช้สารละลายเข้มข้น 4.15 % จำนวน 0.2 cm^3 ได้ผลในการแยกชัดเจนที่สุด
3. สารที่แยกได้ด้วยวิธี Column Chromatography ให้ UV Absorption

Maxima ที่ความยาวคลื่น 280, 280, 250 และ 210 nm และมีค่า R_f 0.93, 0.59, 0.27 และ 0 ตามลำดับ

4. สารที่แยกได้ใน Zone 2 และ 4 ให้ปฏิกริยาต่อ Folin-Ciocalteu's Reagent และ Dragendorff's Reagent ส่วน Zone อื่น ๆ ไม่ให้ปฏิกริยากับสารเคมี (Reagent) ที่ใช้ทดสอบ

5. Percentage Yield ทั้งหมดของสารที่แยกได้ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography มีค่าประมาณ 59 และ 80 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ

1. Solvent System อื่น ๆ

2. Detecting และ Reagent ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบสารที่แยกได้

3. สารที่แยกได้แล้วนี้ ควรศึกษาต่อไปถึงรูปสมบัติทางเคมี, กายภาพ, โครงสร้าง และคุณสมบัติทางยา ซึ่งจะทำให้ผลงานนี้สามารถประยุกต์ให้ได้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้เต็มที่

4. ควรจะศึกษาสารที่ได้จาก Zone เดียวกันว่าเป็นสารบริสุทธิ์ หรือประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีค่า R_f เดียวกัน ในการวิจัยครั้งนี้มีเวลาจำกัด ทำการทดลองเฉพาะ One Dimension TLC ดังนั้นจึงควรทดลองทำ Two Dimension TLC และเปลี่ยน Solvent System เพื่อว่าอาจจะแยกสารใน Zone ต่าง ๆ ได้ต่อไปอีก

5. การวิจัยที่จะจัดให้นิสิตนักศึกษาดำเนินการ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาระดับต่าง ๆ ในมหาวิทยาลัย หากได้มีการประสานงานกันกับหน่วยราชการและสถานวิจัยต่าง ๆ ซึ่งปฏิบัติงานวิจัยอยู่บ้างแล้วจะสามารถทำให้งานวิจัยตามหลักสูตรบังคับของมหาวิทยาลัยนั้น สามารถนำผลในด้านนำไปประยุกต์ให้เกิดประโยชน์แก่ประเทศชาติเป็นส่วนรวมได้เร็วขึ้น.

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ราชบัณฑิตสถาน, พจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตสถาน พ.ศ. 2493, โรงพิมพ์ศาสนา ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 11 พ.ศ. 2513, 1053 หน้า.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, ไม้เทศเมืองไทย สรรพคุณของยาเทศและยาไทย, โรงพิมพ์ไทยเทอดธรรม, 2508, 596 หน้า.

Chen, Shi-Chow, Structural Studies On The Bitter Principle From Brucea sumatrana, J. Chin. Chem. Soc. (Taipei), 223 - 239 pp., 1971.

Chen-Yu-Sang, A Note On Brucellin, The Active Principle Of Ya-Tan-Tzu: A Chinese Antiamebic Drug, J. Am. Pharm. Assoc. 38, 1949, 620 p.

Dick, J.G., Analytical Chemistry, McGraw-Hill, Kogakusha, Ltd., 1973, 696 p.

Duncan, G.R.; Henderson, D.E., Bruceines From Brucea sumatrana : The Structure Of Bruceine G., Experientia 24(8) : 768 - 769 pp., 1968.

Ewing, W. Galen, Instrucmental Methods Of Chemical Analysis, 3rd Edition, Mc.Graw-Hill, Kogakusha, Ltd., 1969, 627 p.

Geissman, T.A.; Sims, J. James, Simarubaceous Plant Principles Of Brucea Sumatrana, Collog. Int. Centre Nat. Rech. Sci No 144, 1966, 205 - 208 pp.

Huang, Chien-Li, Pharmacological Studies On Ya-tan-tzu, An Antiamebic Chinese Drug, Third Report : Pharmacological Actions Of The Crystalline Principles, Nagasaki Igak kai Zassi 34(9) : 105 - 111 pp., 1959.

Jen-Hung Chu, A Study Of The Chinese Drug Koo-shong-tse, Ko-Hsuen T' ung-Pao (Scientific News) 1, 459 p., 1950.

Kupchan, S., Morris; et al, Tumor Inhibitor, 100 Isolation and Structure Elucidation Of Bruceantin And Bruceantinol, New Plant Antileukemic Quassinoids From Brucea antidysenterica, J. Org. Chem., 40 (5), 648 - 654 pp., 1975.

Liao, Lon-Lon; Kupchan, S. Morris; Horwitz, Susan B., Mode Of Action Of Antitumor Compound Bruceantin, An Inhibitor Of Protein Synthesis, Mol Pharmacol, 12 (1), 167 - 176 pp., 1976.

Polongsky, Judith; et al, Constituants Amers De Br ea amarissind, Structure Des Bruceine A, B et C, Experientia 23 (6) : 424 - 426 pp., 1967.

Polongsky, Judith; et al, Sur Les Constituants Amers Du Brucea amarissima : Structure Des Bruceines D et E, C. R. Acad. Sci., Paris ser. C., 267 (20) : 1346 - 1349 pp., 1968.

Stahl E., Thin-Layer Chromatography : A Laboratory Hand Book, New York Academic Pressing, 1965, 485 - 502 pp.

Sim, Keng Y.; Sim, James J.; Geissman, T.A., Coustituents Of Brucea sumatrana, J. Org. Chem. 33(1) 429 - 431 pp., 1968.

Stocklin, W.; Geissman, T.A., A New Bitter Principle From Brucea sumatrana, Roxb. Tetrahedron Lett. (57) ; 6007 - 6010 pp., 1967.

Wasuwat, Sasithorn and Coworker, Study On Antiamoebiasis Property, In Vitro Of The Extracts Of Brucea amarissima (Lour) Merr. (Ratchadat), Report of Applied Scientific Research Corporation Of Thailand, Bangkok, 1973, 12 p.

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้

1. Acetone
2. Benzene
3. Diethyl ether
4. Hexane
5. Cyclohexane
6. Chloroform
7. Ethyl alcohol
8. Methyl alcohol
9. Carbon tetrachloride
10. Ethyl acetate
11. Sodium tungstenate
12. Sodium Molybdate
13. Orthe phosphoric acid
14. conc. Hydrochloric acid
15. Lithium sulphate
16. Bromine
17. Sodium carbonate
18. Bismuth carbonate
19. Sodium iodide
20. Glacial acetic acid
21. 0.5 N. Sulphuric acid
22. Glass wool ของบริษัท Gallenkamp, England.
23. Alumina G ของ E. Merk Ag. Darmstadt, Germany
24. Silica Gel ของ E. Merk AG. Darmstadt, Germany.

25. Silica Gel G. ของ E. Merk AG. Darmstadt, Germany.

หมายเหตุ

ตั้งแต่หมายเลข 1 – 21 ใช้ของ BDH

Chemicals Ltd., Poole England.

ชนิด Analytical Grade.

อุปกรณ์ที่ใช้

1. Glass Column (For CC.)
2. Glass Plate Size 20 x 20 cm. (For TLC)
3. Desaga, Heidelberg, Germany.
4. Oven
5. Thermostat Vacuum Oven
6. UV Light (or UV Lamp.)
7. UV Spectrophotometer, Beckman Model DB-G
8. Rotavapor-R, ของ Buchi, Switzerland
9. Electrical Balance

Reagent ที่ใช้ทดสอบสาร

1. Folin-Ciocalteu's Reagent

วิธีเตรียม Sodium tungstenate 10 g. Sodium molyodate 0.5 g. ละลายในน้ำ 70 cm^3 เติม H_3PO_4 (85 %) 5 cm^3 และ HCl conc. 10 cm^3 นำส่วนผสมนี้ไป Reflux 10 ชั่วโมง แล้วเติม Lithium sulphate 15 g. และน้ำ 5 cm^3 แล้วหยด Bromine ลงไป 1 หยด ต้มให้เดือด 15 นาที เติมน้ำให้ครบ 100 cm^3 สารละลายที่ได้ต้องไม่เป็นสีเขียว เก็บสารละลายนี้เป็น Stock Solution

วิธีใช้ พ่น (Spray) สารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 20 % ลงบน Plate เป่าให้แห้งโดยเร็ว แล้วพ่นด้วย Stock Solution

การทดสอบ Reagent นี้ ใช้ทดสอบ Phenolic Compound ซึ่งจะให้สีน้ำเงิน บน Background สีขาว หรือไม่มีสี (Plate ฉาบด้วย Silica Gel G.)

Reagent ที่ใช้ทดสอบสาร (ต่อ)

2. Dragendorff's Reagent

วิธีเตรียม Bismuth carbonate 2.6 g. Sodium iodide 70 g. รวมกับ Glacial acetic acid 25 cm^3 ต้มให้เดือดเป็นเวลา 2 – 3 นาที ทิ้งให้ตกตะกอน 12 ชั่วโมง กรองตะกอน Sodium acetate ที่เกิดออกโดยใช้กรวย Sintered Glass นำน้ำยาที่กรองแล้ว (สีน้ำตาลแดงใส) 20 cm^3 ผสมกับ Ethyl acetate 8 cm^3 เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลเป็น Stock Solution

วิธีใช้ นำ Stock Solution 10 cm^3 ผสมกับ Glacial acetic acid 25 cm^3 และ Ethyl acetate 60 cm^3 แล้วพ่น (Spray) บน Plate TLC

การทดสอบ Reagent นี้ ใช้ทดสอบสาร Alkaloids และ Nitrogen Free Compound ซึ่งจะให้สีส้มบน Background สีเทา (Plate ฉาบด้วย Silica Gel G.)

สีส้มจะเข้มขึ้นถ้าพ่นทับด้วย 0.25 M. H_2SO_4

Reagent ที่ใช้ทดสอบสาร (ต่อ)

3. Phosphomolybdic acid 5 % (al)

วิธีเตรียม 5 g. Phosphomolybdic acid ละลายใน Ethyl alcohol 100 cm^3 แล้วอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 – 90° C เป็นเวลา 5 นาที

วิธีใช้ นำสารละลายที่ได้พ่นลงบน Plate

การทดสอบ Reagent นี้ ใช้ทดสอบ Phenolic Compound ซึ่งจะให้สีเทา – ดำ บน Background สีเหลือง (Plate ฉาบด้วย Silica Gel G.)

หมายเหตุ รายละเอียด Reagents ที่ใช้ทดสอบ คัดจากหนังสือ

Thin-layer Chromatography : A Laboratory Hand Book. By E. Stahl, New York Academic Pressing, 1965, 485 - 502 pp.

ตาราง 1 ปริมาณสารที่แยกได้จากการ Run TLC ของ Zone 1 - 4 จาก Plate 3 แผ่น

No.	Dish + B.a. (g.)	Dish. (g.)	B.a. (g.)	หมายเหตุ
P_{11}	19.0939	19.0933	0.0006	
P_{12}	15.1306	15.1300	0.0006	
P_{13}	14.4133	14.4122	0.0011	
P_{14}	14.1365	14.1339	0.0026	
P_{21}	14.5794	14.5788	0.0006	
P_{22}	15.1198	15.1191	0.0007	
P_{23}	16.4559	16.4549	0.0010	
P_{24}	15.5130	15.5105	0.0025	
P_{31}	15.5253	15.5248	0.0005	
P_{32}	17.8880	17.8873	0.0007	
P_{33}	16.1837	16.1827	0.0010	
P_{34}	16.0408	16.0382	0.0026	

P_{12} คือ Zone 2 ของ Plate แผ่นที่ 1

B.a. คือ Brucea amarissima (ราชดัด)

ตาราง 2 ตัวทำละลาย 10 ชนิด และผลการแยกสารส่วนที่เป็นพิษของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

No	Solvent System (v/v)	Duration of Run (mn)	Detecting	Zone separation
1	Hexane : Chloroform : Diethyl ether = 1:1:2	48	UV Light	-
2	Carbontetrachloride : Chloroform : Ethyl acetate = 3:2:1	50	UV Light	-
3	Cyclohexane : Benrene : Diethyl ether = 3:2:1	50	UV Light	-
4	Benzene : Ethyl acetate : Ethanol = 2:2:1	53	UV Light	2
5	Diethyl ether : Ethyl acetate : Ethanol = 3:2:1	55	UV Light	-
6	Diethyl ether : Ethyl acetate : Ethanol = 2:1:2	55	UV Light	-
7	Benzene : Ethyl acetate : Ethanol = 2:1 2	50	UV Light	-
8	Benzene : Hexane : Ethanol = 3:2:3	52	UV Light	-
9	Benzene : Ethyl acetate : Ethanol = 3:2:1	55	UV Light	4
10	Benzene : Ethyl acetate : Ethanol = 6:4:1	53	UV Light	-

ตาราง 3 ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้ (Zone 1 - 4) ด้วยวิธี TLC

Zone Separation	R_f x 100										R_f เฉลี่ย (x100)	UV Absorption Maxima (nm.)	ปริมาณสารที่แยกได้ (g.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	230 - 220	0.0006
2	25	28	31	27	28	25	30	25	26	25	27	250	0.0007
3	58	63	60	61	58	58	52	56	66	62	59	280	0.0010
4	96	03	03	94	94	94	93	93	91	93	93	280	0.0026

ตาราง 4 น้ำหนักสารที่แยกได้ด้วยวิธี Column Chromatography

No of. Column	น้ำหนักสารที่ใช้ (g.)	ตัวชะ (Eluent)	น้ำหนักสารที่แยกได้ (g.)	% Yield แต่ละสาร	% Yield ทั้งหมด	หมายเหตุ
1	0.8420	Benzene	0.1233	14.70	83.49	
		Ethyl acetate	0.3072	36.48		
		95 % EtOH	0.2721	32.31		
2	1.1155	Benzene	0.2023	18.13	79.27	
		Ethyl acetate	0.3958	31.89		
		95 % EtOH	0.3264	29.25		
3	0.6252	Benzene	0.1162	18.58	80.65	
		Ethyl acetate	0.2186	34.96		
		95 % EtOH	0.1695	27.11		