สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ

นายสมทบ สันติเบ็ญจกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ปพ.
ส249ก
2540
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 32017
วัน, เดือน, ปี - 8 ม.ค. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study in The Chemical Constituents of The Natural Products

Mr. Somtop Santibenchakul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut' s Institute of Technology Ladkrabang

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ
โดย	นาย สมทบ สันติเบ็ญจกุล
ภาควิชา	เคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. พัชนี เจริญยิ่ง
	อ. สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล
	ผศ. ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ผศ. นงนุช เภตรานุวัฒน์)
หัวหน้าภาควิชาเคมี
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ดร. ตะวัน สุขน้อย)
ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์)
กรรมการ

(ดร. สมศักดิ์ วรมงคลชัย)
กรรมการ

(อ. สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล)
กรรมการ

พัชนี เจริญยิ่ง
(ดร. พัชนี เจริญยิ่ง)
กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ
นักศึกษา	นาย สมทบ สันติเบ็ญจกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. พัชนี เจริญยิ่ง
	อ. สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล
	ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

มะฮอกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)* เป็นไม้พื้นเมืองของประเทศเม็กซิโก ได้มีการนำมาใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูงโดยชาวมาเลเซีย จนมีการศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆของต้น เพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์ ในโครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษา ส่วนของเปลือกรากและรากของต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)* เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย ในการทดลองใช้เทคนิค ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี และ คอลัมน์โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคในการแยกสารสำคัญออกจากส่วนของเปลือกรากและรากของต้น และนำสารที่แยกได้ไปศึกษาหาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี

จากการทดลอง พบว่า รากของต้นมะฮอกกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)* ที่สกัดได้จากเมทานอลและเฮกเซน มีฤทธิ์ต่อต้านมาเลเรีย โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการหาส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของรากซึ่งสกัดด้วย เมทานอลและเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study in The Chemical Constituents of The Natural Products
Name	Mr. Somtop Santibenchakul
Special Project Advisor	Dr. Patchanee Charoenying
	Mrs. Sujin Tantipisitkul
	Asst.Prof.Dr. Theerawat Mongkolausawarat
Department	Chemistry
Academic	1997

Abstract

Swietenia Macrophylla King grows commonly in the tropical areas of Mexico. It has been reported in providing cure to high blood pressure. The pure compounds were isolated and tested in medical. In this research , we concentrated on natural antimalariral agents in the part of root and root bark of *Swietenia Macrophylla King*. Thin Layer Chromatography and Column Chromatography were used in the separation of important compounds. Furthermore, we determined the compound structures by spectroscopic method.

It was found that the crude extracts of root of *Swietenia Macrophylla King* in methanol and hexane gave antimalarial active. Hence, we attempted to separate the compounds from crude extracts in puritical form.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงงานพิเศษนี้ สำเร็จและลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากการได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ การอำนวยความสะดวกและสิ่งที่เป็นประโยชน์ ของคณาจารย์และผู้เกี่ยวข้องแก่ผู้จัดทำ ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.พัชนี เจริญยิ่ง คอยเอาใจใส่ในโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างมาก ให้ความช่วยเหลือ ทั้งด้านการทดลอง ตลอดจน เอกสารที่จำเป็นสำหรับโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ อ. สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล ให้ความกรุณาคอยดูแล เอาใจใส่ และถามไถ่ พร้อมคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากทุกขั้นตอนการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ สำหรับคำแนะนำ ความเอาใจใส่ ด้านการทดลองและการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. ตะวัน สุขน้อย และ ดร. สมศักดิ์ วรมงคลชัย อาจารย์คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ให้ความกรุณาแก้ไข โครงงานพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณ รัชดา จันทร์เพ็ญ และเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ให้ความอนุเคราะห์ด้านการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย

สุดท้ายกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ขอบคุณเพื่อนๆ สำหรับความรู้สึกดีๆที่มีให้ รุ่นพี่ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและแนะนำแนวทางในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ รุ่นน้อง ช่วยเหลือในด้านการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ และกำลังใจที่ดีที่สุด เจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวก ช่วยเหลือ และคำแนะนำมาโดยตลอด

นอกจากนี้บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือที่มิได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นาย สมทบ สันติเบ็ญจกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
อักษรย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ ที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 สมุนไพร	3
2.2 วิธีการสกัดสมุนไพร	4
2.3 ขั้นตอนการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยา	5
2.4 มาลาเรีย	10
2.5 สมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมาเลเรีย	11
2.6 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย	11
2.7 มะฮอกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)*	17
2.8 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3.2 ขั้นตอนการวิจัย 22

3.3 วิธีทดลอง 23

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการวิจารณ์

4.1 ศึกษาการหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้การแยกสารด้วยวิธี column chromatography 28

4.2 ผลการทดสอบ crude extract ทางเภสัชวิทยา 30

4.3 ผลการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆโดยวิธี column chromatography 31

4.4 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลและโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค IR, NMR และ MS 36

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย 58

5.2 ข้อเสนอแนะ 61

เอกสารอ้างอิง 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่างๆ 28

ตารางที่ 4.2 ผลการเรืองแสงต่อแสง UV ของ crude extract ในชั้นต่างๆ 28

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียของเปลือกรากและราก ไม้มะฮอกกะนีใบใหญ่ 30

ตารางที่ 4.4 รายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography 31

ตารางที่ 4.5 solvent system ที่ใช้ในการเก็บสารในแต่ละหลอดของการแยก crude extract ชั้น methanol 32

ตารางที่ 4.6 ผลสรุปการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography 32

ตารางที่ 4.7 รายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography 33

ตารางที่ 4.8 solvent system ที่ใช้ในการเก็บสารในแต่ละหลอดของการแยก crude extract ชั้น hexane 33-34

ตารางที่ 4.9 ผลการแยกสารของ crude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography 34

ตารางที่ 4.10 ผลสรุปการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography 35

ตารางที่ 4.11 ลักษณะของสารที่แยกได้จาก crude extract ชั้น hexane 35

ตารางที่ 4.12 รหัสของสารที่แยกออกจาก crude extract ชั้นต่างๆด้วย column chromatography 36

ตารางที่ 4.13 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆของสาร SM(R)(M)/1 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ตารางที่ 4.14 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัล
ที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆของสาร SM(R)(H)/1 42

ตารางที่ 4.15 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัล
ที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆของสาร SM(R)(H)/3 48

ตารางที่ 4.16 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัล
ที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆของสาร SM(R)(H)/4 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Quinine และ Quinidine 12

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ Febrifugine 12

รูปที่ 2.3 ตัวอย่างโครงสร้างของ Carboline alkaliod 13

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ Artemisinin 13

รูปที่ 2.5 ตัวอย่างโครงสร้างของ Quassinoid 14

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ Eurycomalactone 14

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ Bruceines 15

รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ Nimbolide 15

รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ Gedunin 16

รูปที่ 2.10 โครงสร้างของ Pristimerin 16

รูปที่ 2.11 ต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)* 17

รูปที่ 2.12 โครงสร้างของ Swietenolide และ diacetate 18

รูปที่ 2.13 ตัวอย่างโครงสร้างของ polyacetylene 18

รูปที่ 4.1 รูปถ่ายแสดงผลการแยกของ crude extract ในชั้นต่างๆ ด้วย TLC โดยผ่านการย้อมสีด้วย developing solvent 29

รูปที่ 4.2 IR spectrum ของ SM(R)(M)/1 39

รูปที่ 4.3 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(M)/1 40

รูปที่ 4.4 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(M)/1 41

รูปที่ 4.5 IR spectrum ของ SM(R)(H)/1 44

รูปที่ 4.6 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(H)/1 45

รูปที่ 4.7 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(H)/1 46

รูปที่ 4.8 IR spectrum ของ SM(R)(H)/3 50

รูปที่ 4.9 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(H)/3 51

รูปที่ 4.10 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(H)/3 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 4.11 IR spectrum ของ SM(R)(H)/4 55

รูปที่ 4.12 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(H)/4 56

รูปที่ 4.13 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(H)/4 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

BR	Bark root
CD_3OD	Tetradeutero methanol
$CDCl_3$	Deutero chlorofrom
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Et	Ethyl group
H	Hexane
IR	Infrared
M	Methanol
Me	Methyl group
MS	Mass spectroscopy
NMR	Nuclear magnetic resonance
R	Root
SM	*Swietenia Macrophylla King*
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Tetramethylsilane
UV	Ultra violet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสร้างประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรไทยได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคและถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น การเพิ่มประสิทธิภาพในตัวยารักษาโรคจึงได้มีการทำการวิจัยสมุนไพรจากพันธุ์ไม้ต่างๆ ต้นมะฮอกกะนีเป็นสมุนไพรไทยประเภทหนึ่งที่มีผู้ศึกษาในส่วนที่เป็นตัวเปลือก ใบ ลำต้น ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงศึกษาส่วนที่เป็นเปลือกรากและรากไม้ โดยนำเทคนิคพื้นฐานทางด้านเคมีอินทรีย์มาประยุกต์ใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการแยกสารประกอบจากต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่
2. ศึกษาการหาโครงสร้างของส่วนประกอบทางเคมีของต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติที่มีผลในการรักษาโรค โดยสมุนไพรที่ทำการศึกษาคือ เปลือกรากและรากของต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่ โดยข้อมูลที่ได้จะนำไปศึกษาและเปรียบเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคนั้นทางเภสัชวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ว่าสารที่แยกได้จากรากไม้มะฮอกกะนีใบใหญ่มีผลในการใช้เป็นตัวยาในการรักษาโรค ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ ถ้าผลการตรวจสอบทางเภสัชวินิจฉัยได้เช่นเดียวกับสารที่สกัดได้จากสมุนไพรประเภทอื่นที่พิสูจน์แล้วว่าใช้รักษาโรคได้ จะนำไปสู่การศึกษารายละเอียดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการเตรียมและการเก็บรักษา สมุนไพรธรรมชาติที่จะใช้ในการวิจัย

2. ทราบถึงวิธีการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร

3. ทราบถึงวิธีการหาระบบของสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรธรรมชาติ

4. ทราบถึงวิธีการแยกสารสำคัญ และการเก็บรักษาเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญ

5. ทราบถึงวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญในสมุนไพรธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สมุนไพร

สมุนไพร ตามความหมายของพระราชบัญญัติยา หมายถึงยาที่ได้จากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งยังมิได้ผสมหรือแปรสภาพ เช่น ในส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล

นักวิทยาศาสตร์ปัจจุบันเชื่อว่าการที่มนุษย์รู้ว่าต้นไม้ใดใช้รักษาโรคใด มีสรรพคุณอย่างไรนั้นได้จากการเรียนรู้ด้วยประสบการณ์และการทดลองอันยาวนานสืบต่อกันมาแต่โบราณ บางครั้งอาจอาศัยจากรูปลักษณะเหมือนอวัยวะใด ก็ใช้รักษาอวัยวะนั้น หรือโดยอาศัยสีหรือรสชาติ เช่น สีแดงรักษาโรคเกี่ยวกับเลือด หรือรสขมรักษาโรคเกี่ยวกับน้ำดี เป็นต้น

จากการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์ การสกัดและแยกสารเคมีบริสุทธิ์ที่ได้จากพืช ทำให้นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสารเคมีเหล่านี้เองที่เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชสมุนไพรนั้นๆ

จากการศึกษาถึงสารเคมีที่แยกได้จากพืช ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ ซึ่งอาจจำแนกออกเป็น 9 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)

คือสารที่ประกอบด้วย C, H และ O ในปัจจุบันกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในทางยา มักใช้อยู่ในรูปของ glucose, starch, agar, pectin เป็นต้น

2. แอลคาลอยด์ (alkaloid)

เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ คุณสมบัติส่วนใหญ่มีรสขมไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ มีฤทธิ์เป็นด่าง และมักมีฤทธิ์ต่อระบบต่างๆของร่างกายพบมากในส่วนต่างๆของพืช เช่น ในเมล็ดของหมาก, ในผลของพริกไทย, ในเปลือกของซิงโคนา, ในรากของระย่อม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไกลโคไซด์ (glycoside)

เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น aglycone (genin) กับส่วนที่เป็นน้ำตาลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบกลุ่มนี้จะกว้างขวางมากแตกต่างกันออกไป

4. น้ำมันระเหย (volatile oil or essential oil) เป็นน้ำมันที่ได้จากพืชโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ หรือการบีบ มีกลิ่นรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ ประโยชน์ทางด้านยานอกจากใช้เป็นตัวแต่งกลิ่น จะใช้ไปในทางขับลม ฆ่าเชื้อและทาถูนวด

5. ไขมัน (lipid)

คือสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ประโยชน์ใช้เตรียมขี้ผึ้ง หรือใช้เป็นยาระบาย รักษาโรคผิวหนัง

6. เรซิน (resin)

คือสารอินทรีย์หรือสารผสมประเภทโพลิเมอร์ มีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่ละลายน้ำ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

7. วิตามิน (vitamin)

หมายถึงสารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่เล็กน้อยในอาหาร

8. ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

เป็นผลิตผลทางเคมีที่ได้จากสิ่งมีชีวิต

9. สเตอรอยด์ (steroid)

คือสารอินทรีย์ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาโดยพืชและสัตว์

2.2 วิธีการสกัดสมุนไพร

การสกัดจากสมุนไพร มี 5 วิธีคือ

1. infusion เป็นวิธีการนำเอาสมุนไพรที่บดหยาบ ๆ มาสกัดเอาตัวยาที่สามารถละลายน้ำออกมา โดยการแช่สมุนไพรนั้นในน้ำเย็นหรือน้ำร้อนชั่วระยะเวลาหนึ่ง ยาชงที่ได้เก็บได้ไม่นาน จึงต้องเตรียมใหม่ๆทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. decoction เป็นวิธีการต้มสมุนไพรกับน้ำเพื่อสกัดเอาตัวยาที่ละลายน้ำออกมาโดยการเติมน้ำเย็นลงผสมกับสมุนไพรในภาชนะที่เหมาะสมแล้วต้มเป็นเวลานานประมาณ 15 นาที ทิ้งให้เย็น บีบกากเพื่อเอาน้ำที่ยังค้างอยู่ในกากออกมาด้วย อาจจะต้องกรองเมื่อจำเป็น แล้วจึงเติมน้ำเพื่อให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ การสกัดโดยวิธีนี้ทำได้เฉพาะสมุนไพรที่มีตัวยาที่ละลายน้ำ และทนต่อความร้อน การสกัดวิธีนี้มักได้น้ำตาล โปรตีน ปนมากับตัวยาด้วย

3. digestion ต่างจากยาชงและยาต้มที่ใช้เวลานานกว่า และใช้อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส

4. macreation คือการหมักสมุนไพรที่บดได้ขนาดตามที่ต้องการในตัวทำละลายที่เหมาะสม อาจใช้เวลา 3-7 วัน หรือตามความเหมาะสม และต้องเขย่าเป็นครั้งคราว

5. Percoration คือการสกัดโดยวิธีให้ตัวทำละลายค่อยๆไหลผ่าน column พิเศษ ที่บรรจุสมุนไพรสำหรับสกัดโดยวิธีนี้โดยเฉพาะ เมื่อได้สารสกัดตามวิธีข้างต้น ก็สามารถที่จะนำสารสกัดซึ่งอาจมีตัวยาหลายชนิดปนกันอยู่ดำเนินการต่อได้ 3 วิธีด้วยกันคือ

5.1 การสกัดบริสุทธิ์ โดยนำวิธีการแยกสารด้วยกรรมวิธีต่างๆ เพื่อแยกให้ได้ตัวยาที่ต้องการในรูปของสารบริสุทธิ์

5.2 การสกัดกึ่งสังเคราะห์ โดยนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้ไปดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี เพื่อให้ได้สารใหม่ ที่มีคุณสมบัติในการรักษาที่ดีขึ้น หรือมีพิษน้อยลง

5.3 การสกัดอย่างหยาบ โดยนำสารสกัดที่ได้มาเตรียมยาในรูปยาเตรียมอย่างง่าย ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้เลย หรือนำไปผสมกับยาเตรียมอื่น[1]

2.3 ขั้นตอนการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยา

ในการนำสารบริสุทธิ์มาใช้เป็นยาจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนต่างๆดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. <u>การเตรียมตัวอย่างพืช</u> (Plant material preparation)

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึง สิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่ การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นปน ไม่มีโรคพืช และผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืช การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยวิธีการทำสมุนไพรให้แห้งโดยคงคุณภาพของสมุนไพร ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็ว และใช้อุณหภูมิต่ำๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปได้

2. <u>การสกัดสารสำคัญจากพืช</u> (Extraction)

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน การสกัดที่ใช้ในการวิจัยคือ Macreation เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถเป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก(marc)ให้มากที่สุดรวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

<u>การเลือกใช้ตัวทำละลาย</u>

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมตัวทำละลายที่ดีควรมีสมบัติ

1. เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาพอสมควร

<u>ในการเลือกใช้ตัวทำละลายเราอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้คือ</u>

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด(selectivity)

3. <u>การทำสารสกัดให้เข้มข้น</u> (Concentration)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อน วิธีที่ใช้ในการวิจัยคือ Distillation in vacuo เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ distillation flask condenser , receiving flask และ distillation flask จะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ

4. <u>การแยกส่วนผสม</u> (Separation)

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมีเพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่างๆ

<u>Thin- layer Chromatography</u> (TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ stationary phase ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว aluminium หรือ polyethylene เมื่อหยดสารลงบน stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ tank ซึ่งบรรจุ mobile phase ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า development ขณะที่เกิดการ development สารก็จะแยกออกจากกัน

<u>การประยุกต์ใช้ TLC ในการศึกษาสารเคมีจากสมุนไพร</u>

1.ใช้วิเคราะห์หาสารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และบางครั้งอาจบอกได้ว่าเป็นสารประเภทใด

2.ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อหา solvent system สำหรับ column chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ใช้ตรวจสอบ fraction ที่ได้มาจาก column chromatography เพื่อรวม fraction ที่เหมือนกัน

4. แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย

5.ใช้แยกสารปริมาณมาก ซึ่งแยกโดยวิธี column chromatography ไม่ได้ผล

6.ใช้หาปริมาณสารในสารผสม

Column chromatography

เป็นวิธีการแยกสารโดยให้สารเคลื่อนที่ไปบน stationary phase ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วกลวง

- Column เป็นหลอดแก้วกลวง โดยมากจะต้องมีอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวของหลอดแก้วกลวง = 1 : 10 การจะใช้ column ยาวเท่าไรขึ้นอยู่กับความยากง่ายในการแยก ถ้า column ยาวจะยิ่งแยกดีขึ้น เหมาะสำหรับแยกสารเป็นจำนวนมาก

- adsorbent ชนิดของ adsorbent ที่ใช้ก็เช่นเดียวกับ adsorbent ของTLC อัตราส่วนของ adsorbentที่ใช้ และปริมาณสารที่จะแยก ขึ้นกับกระบวนการแยก

5. **การตรวจสอบเอกลักษณ์** (Identification)

ใช้เทคนิคทาง spectroscopy เช่น IR , NMR เป็นต้น ในการวิเคราะห์สารที่แยกออกมาได้จากส่วนผสม[2]

อินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (infrared spectrophotometer)

อินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่นิยมใช้กันในปัจจุบันชนิดลำรังสีคู่ (double beam spectrophotometer) แหล่งกำเนิดรังสีอินฟราเรดคือ globar หรือ Nemst filament ซึ่งเผาให้ร้อนด้วยไฟฟ้าถึง 1000-1800 องศาเซลเซียส

อินฟราเรดสเปคตรัมที่ปรากฏบนกระดาษบันทึก สเปคตรัมจะมีลักษณะเป็นพัดที่ชี้ลง (downward peak) เกิดจากการพลอต transmittance และความยาวคลื่นหรือความถี่ transmittance คือ อัตราส่วนของความเข้มของลำรังสีที่ผ่านเซลล์บรรจุสารตัวอย่าง และความเข้มของลำรังสีที่ผ่านเซลล์อ้างอิง นิยมวัดในรูป percentage transmittance

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของอินฟราเรดสเปคตรัม

1.ใช้หาข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของสาร

โดยพิจารณาช่วงความถี่ของแถบดูดกลืนรังสีของพันธะชนิดต่างๆ ในอินฟราเรดสเปคตรัม

2.ใช้สำหรับเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์โครงสร้างของสาร

อินฟราเรดสเปคตรัมของสารประกอบสองตัวที่วัดในตัวกลางเดียวกัน สามารถจะนำมาเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารตัวเดียวกัน

การวิเคราะห์อินฟราเรดสเปคตรัม

ในการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปคตรัมของสาร unknown ควรจะมุ่งความสนใจต่อแถบดูดกลืนรังสีของหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญๆ เช่น C=O, O-H, N-H, C-O, C=C, C≡C, C≡N แถบดูดกลืนรังสีของหมู่ฟังก์ชันนัลเหล่านี้ จะช่วยให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของสาร และตัดสินได้ว่าสาร unknown นั้นเป็นสารประกอบประเภทใด

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer)

NMR สเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้กันทั่วไป เป็นแบบที่คงค่าของความถี่วิทยุไว้และเปลี่ยนค่าความเข้มสนามแม่เหล็ก ปกติ NMR สเปคโตรมิเตอร์เครื่องหนึ่งจะใช้ศึกษาเฉพาะการเปลี่ยนภาวะของนิวเคลียสเพียงชนิดเดียว

chemical shifts ของโปรตอนชนิดต่างๆ

โปรตอนแต่ละชนิดไม่เพียงจะมีค่า chemical shift ต่างกัน จะยังมีค่า chemical shift เฉพาะตัวซึ่งใช้บอกลักษณะเฉพาะของโปรตอนแต่ละชนิดได้

Integrals

ใน NMR สเปคตรัมนั้นที่ใต้สัญญาณแต่ละแผ่นจะแปรผันเป็นสัดส่วนกับจำนวนโปรตอนที่ก่อให้เกิดสัญญาณนั้นโดยความสูงของเส้น integral บอกอัตราส่วนของโปรตอนแต่ละชนิดในโมเลกุลนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>แมสสเปคโตรเมตรี</u> (Mass Spectrometry)

วิธีการของแมสสเปคโตรเมตรี เริ่มต้นจากการที่สารตัวอย่างถูกยิง (bombarded) ด้วยอิเล็กตรอนพลังงานสูง ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุล 1 ตัว เกิดไอออน (iron) ที่มีประจุบวกเรียกว่า Molecular ion ซึ่งสามารถจะเกิดการแตกหัก ต่อไปเป็น fragment ions ไอออนทั้งหมดรวมทั้ง molecular ions จะถูกแยกตามอัตราส่วนของมวลตัวประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/e) ของมัน อัตราส่วนต่อมวลของประจุของไอออนเหล่านี้จะถูกบันทึกในกระดาษบันทึกสเปคตรัม สเปคตรัมที่ได้นี้ เรียกว่า แมส สเปคตรัม (mass spectrum) ไอออนส่วนใหญ่เป็นไอออนประจุเดี่ยว (singly charged ions) การบันทึก m/e ของไอออนเหล่านี้ก็คือการบันทึกมวลของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ สารตัวอย่างแต่ละชนิดมีรูปแบบการแตกหัก(fragmentation patterns) ที่เป็นเอกลักษณ์ จะให้ไอออนที่มีค่า m/e เฉพาะซึ่งใช้เป็นข้อมูลในการหาสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่างได้

ข้อดีของแมสสเปคโตรเมตรีอยู่ที่ใช้สารตัวอย่างปริมาณเพียงเล็กน้อยคือ สารตัวอย่างปริมาณเพียงแค่ไมโครกรัมก็สามารถใช้หาแมส สเปคตรัมได้ แต่มีข้อเสียคือ สารตัวอย่างที่ใช้แล้วจะถูกทำลายไปไม่อาจนำกลับมาใช้อีก[3]

เนื่องจากการวิจัยใช้มะออกกะนีใบใหญ่ในการรักษามาลาเรียได้มีผู้เคยนำมาทำการวิจัยและใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย ดังนั้นจะขอกล่าวถึงโรคมาเลเรียและสารที่มีผลต่อการรักษาโรคมาลาเรีย

2.4 มาลาเรีย (Malarial)

มาลาเรียเป็นโรคชุกชุมในประเทศที่อยู่ในเขตร้อนทั่วๆไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาใต้ โรคมาลาเรียเกิดจากเชื้อโปรโตซัวจำพวกพลาสโมเดียม (Plasmodium) ซึ่งเป็นปาราสิตอยู่ในเม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์เลือดอุ่นบางชนิด โรคนี้ติดต่อกันโดยมียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีอุบัติการของโรคมาลาเรียชุกชุม โดยเฉพาะในจังหวัดชายแดนที่ติดต่อกับพม่าและกัมพูชา มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย

การควบคุมโรคมาลาเรียโดยการกำจัดพาหะของโรคคือ ยุงก้นปล่อง ทำให้โรคนี้หมดไปจากหลายประเทศ อย่างไรก็ตามการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงก้นปล่อง ทำให้การกำจัดป้องกันและรักษาโรคนี้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าตัวยาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษามาลาเรีย ทั้งจากการสังเคราะห์และสารธรรมชาติที่แยกได้จากสมุนไพรต่างๆ

2.5 สมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมาลาเรีย (Antimalarial Plants)

สมุนไพรมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคมาเลเรียมาแต่ดึกดำบรรพ์ มีสมุนไพรเป็นจำนวนมากที่มีการใช้เป็นยารักษามาเลเรียในยาพื้นบ้านของประเทศต่างๆ ที่มีโรคชุกชุม จากการสำรวจข้อมูลพบว่ามีพืชถึง 152 สกุลที่มีประวัติการใช้รักษามาลาเรีย

2.6 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Natural Antimalarial Agents)

การศึกษาสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ในยาแผนโบราณในท้องถิ่นต่างๆ ประกอบกับมีการค้นพบวิธีการเพาะเชื้อมาลาเรีย จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียแล้วเป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ สารจำพวกแอลคาลอยด์ และเทอร์ปีน

<u>สารจำพวกแอลคาลอยด์</u>

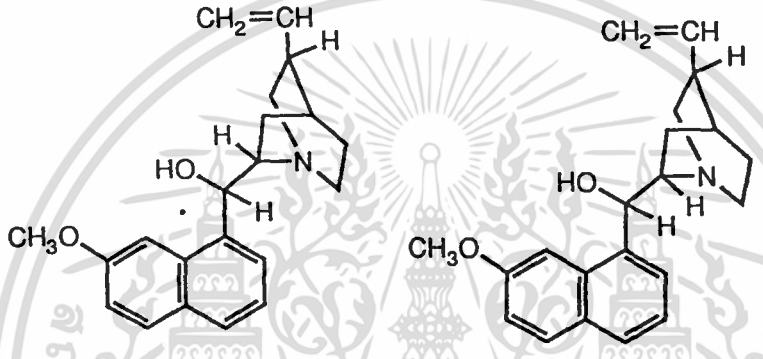
แอลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย มีโครงสร้างหลายแบบด้วยกันดังนี้

- ควินิน

ควินินเป็นยารักษามาลาเรียชนิดแรกที่มนุษย์ค้นพบ โดยแยกได้จากเปลือกซิงโคนา (Cinchona Bark หรือ Jesuit's Bark) ควินินเป็นแอลคาลอยด์สำคัญในเปลือกซิงโคนาซึ่งเป็นไม้พื้นเมืองของที่ราบสูงฝั่งตะวันออกของเทือกเขาแอนเดสในทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 5000-8000 ฟุต ในประเทศเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

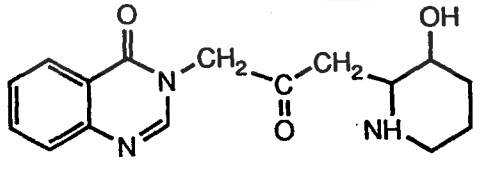
ควาดอร์ เปรู และโบลิเวีย ในเปลือกซิงโคนามีแอลคาลอยด์ประมาณ 30 ชนิดด้วยกัน แต่ที่มีความสำคัญทางยาเป็นอนุพันธุ์ของ quinolyl-quinuclidyl carbinol ควินินและควินิดีน เป็น C-8 stereoisomer ซึ่งกันและกัน โดยมีโครงสร้างเหมือนกันทุกประการ เพียงแต่มีการจัดเรียงตัวของกลุ่มต่างๆรอบ C-8 ต่างกันเท่านั้น ควินินและแอลคาลอยด์ของซิงโคนามีคุณสมบัติในการแก้ไข้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไข้มาลาเรีย ส่วนควินิดีนมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียเช่นกันแต่มีฤทธิ์กดหัวใจด้วย



รูปที่ 2.1 รูปแสดงโครงสร้างของ Quinine และ Quinidine

- Ferbifugine

Febifugine เป็นแอลคาลอยด์สำคัญในสมุนไพรจีน จากการศึกษาพบว่าในใบและรากของฮ่อมคำมีแอลคาลอยด์สำคัญคือ febrifugine ซึ่งมีฤทธิ์ข้างเคียงทำให้มีอาการอาเจียนอย่างรุนแรง และยังมีความเป็นพิษต่อตับสูงอีกด้วย

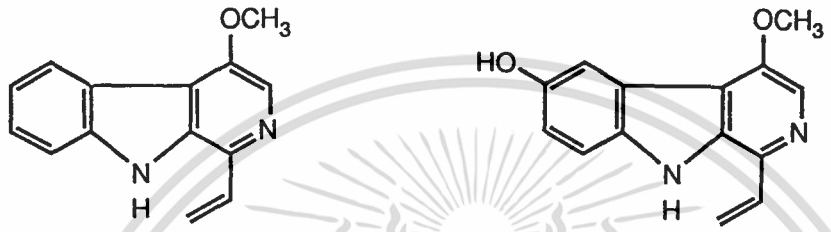


รูปที่ 2.2 รูปแสดงโครงสร้างของ Febritfugine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Carboline Alkaloids

กอมขมเป็นสมุนไพรที่มีประวัติการใช้แก้ไข้ต่างๆ ตลอดจนไข้จับสั่นในตำรายาไทย โดยใช้ส่วนของเนื้อไม้ จากการศึกษาพบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียประเภทแอลคาลอยด์



รูปที่ 2.3 รูปแสดงตัวอย่างโครงสร้างของ Carboline alkaloid

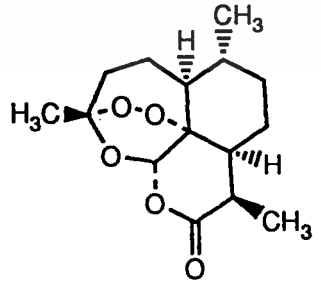
สารจำพวกเทอร์ปีน

สารเทอร์ปีนที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียมีตั้งแต่ sesquiterpene ไปจนถึงไตรเทอร์ปีน

- สารจำพวกเสสควิเทอร์ปีน

Qinghaosu (QHS) หรือ artemisnin

สารที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ซิงเอาซูเป็นยารักษามาลาเรียที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ

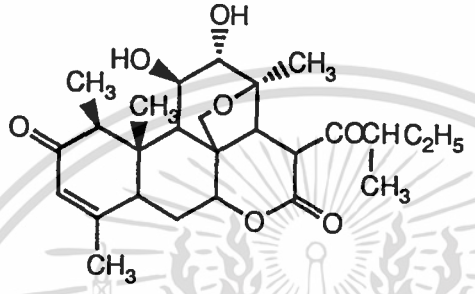


รูปที่ 2.4 รูปแสดงโครงสร้างของ Artemisinin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **สารจำพวก quassinoid**

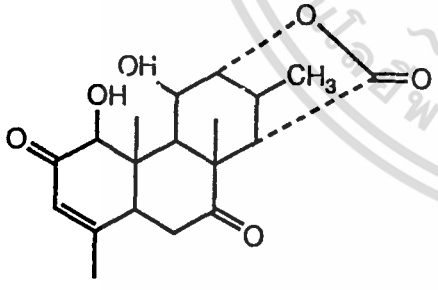
Quassinoids หรือ simarubolides เป็นกลุ่มสารขมซึ่งพบในพืชวงศ์ Simaroubaceae เป็นอนุพันธุ์ของไตรเทอร์ปีน ประกอบด้วย C-18 ถึง C-29 สารในกลุ่มนี้หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียสูงแต่มักมีความเป็นพิษสูงเช่นกัน



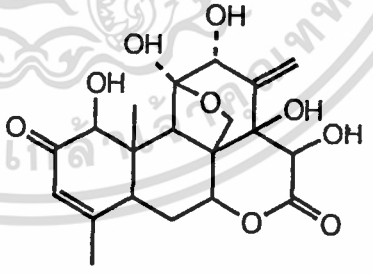
รูปที่ 2.5 รูปแสดงตัวอย่างโครงสร้างของ Quassinoid

Eurycomalactone

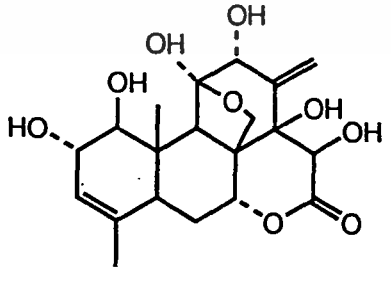
ปลาไหลเผือก เป็นสมุนไพรที่มีการใช้เป็นยาแก้ไข้และไข้จับสั่น ทั้งในประเทศไทยและมาเลเซีย จากการศึกษาส่วนรากของปลาไหลเผือก พบสารจำพวก quassinoid หลายชนิด อาทิ eurycomalactone , eurycomanone และ eurycomanol จากการศึกษาพบว่าสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูง



Eurycomalactone



Eurycomanone



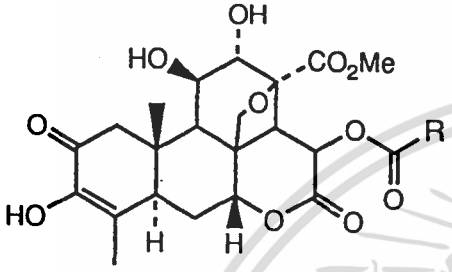
Eurycomanol

รูปที่ 2.6 รูปแสดงโครงสร้างของ Eurycomalactone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bruceines

จากการศึกษาส่วนประกอบเคมีของผลราชดัดพบสารจำพวก quassinoid หลายชนิด รวมทั้ง bruceines A, Bและ C ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย



Bruceine A : R = CH_2CHMe_2
Bruceine B : R = CH_3
Bruceine C : R = $CH = C(CH_3)$-$C(OH)Me_2$
Bruceine : R = $CH = C(CH_3)$-$CHMe_2$

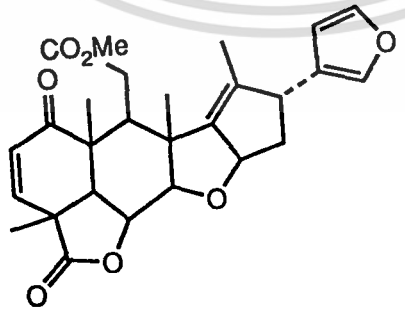
รูปที่ 2.7 รูปแสดงโครงสร้างของ Bruceines

- สารจำพวก limonoids

สารจำพวก limonoids มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียต่ำกว่าสารพวก quassinoid ในขณะเดียวกัน สารเหล่านี้ก็มีความเป็นพิษต่ำกว่าด้วย

Nimbolide

ในใบสะเดา พบว่าสารออกฤทธิ์เป็นสารจำพวก limonoid ได้แก่ nimbolide สารนี้มีความเป็นพิษต่ำ

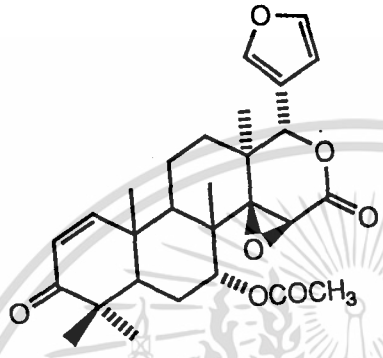


รูปที่ 2.8 รูปแสดงโครงสร้างของ Nimbolide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gedunin

สามารถแยกได้จากเปลือกของต้นสะเดาอินเดีย เป็นสารจำพวก limonoid ซึ่งสามารถต้านเชื้อมาลาเรียได้

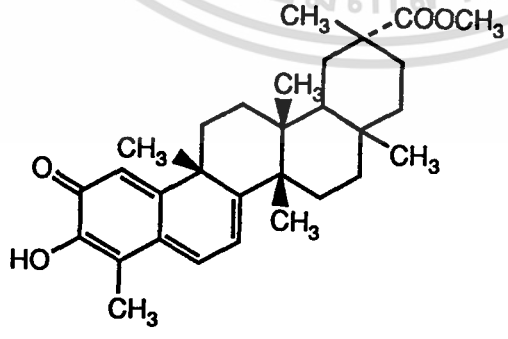


รูปที่ 2.9 รูปแสดงโครงสร้างของ Gedunin

- สารจำพวกไตรเทอร์ปีน

Pristimerin

ส่วนรากของกระทงลายพบว่ามีสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียเป็นสารจำพวก triterpenic acid คือ pristimerin[2]



รูปที่ 2.10 รูปแสดงโครงสร้างของ Pristimerin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.7 **มะฮอกกะนีใบใหญ่** *(Swietenia Macrophylla King)*

มะฮอกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)*

ชื่อสามัญ : Broad leaf Mahogany , False Mahogany

เป็นไม้ต้นผลัดใบขนาดกลางถึงขนาดใหญ่สูง 15-18 เมตร ลำต้นเปลาต้น ใบเป็นใบประกอบ ใบค่อนข้างหนาสีเขียวเข้ม ใต้ใบสีอ่อน ดอกเป็นช่อยาว 10-15 เซนติเมตร เกิดตอนง่ามใบตอนปลายกิ่ง ดอกสีเหลืองอ่อนหรือเหลืองอมเขียว ผลแก่สีน้ำตาลยาว 15 เซนติเมตร ผลแก่แตก 5 พู เปลือกหนาเมล็ดมีสีน้ำตาล เมล็ดอยู่ตอนปลาย ออกดอกเดือน พฤษภาคม-มิถุนายน เป็นไม้พื้นเมืองของเม็กซิโกตอนใต้ นิยมปลูกเป็นไม้ร่มเงา ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด[4]

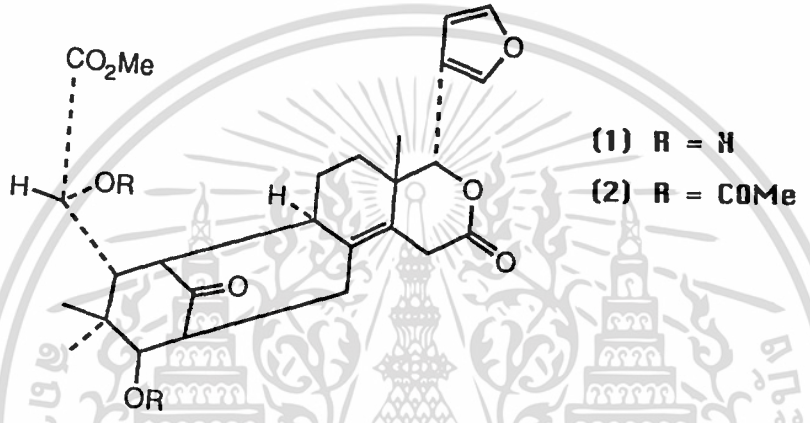
รูปที่ 2.11 รูปแสดงต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่ *(Swietenia Macrophylla King)*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32017

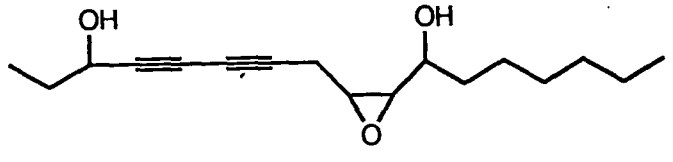
2.8 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey)

ในด้านการรักษาโรค ได้มีรายงานว่า ชาวมาเลเซีย นิยมเคี้ยวและกลืนเมล็ดของ *Swietenia macrophylla* เชื่อกันว่า จะช่วยรักษาโรคความดันโลหิตสูง ด้วยเหตุนี้ ปี 1976 K.C. Chan และผู้ร่วมงาน ได้ทำการแยกสารประกอบจากเมล็ดของมะฮอกกะนีใบใหญ่ โดยพบสารที่มีรสขม Swietenolide (1) เป็นสารประกอบหลัก นอกจากนั้นสามารถแยกออกมาในรูป diacetate (2) ได้ด้วย[5]



รูปที่ 2.12 รูปแสดงโครงสร้างของ Swietenolide และ diacetate

N.Wakabayashiและผู้ร่วมงาน space ได้ค้นพบ polyacetylene จาก Honduras mahogany , *Swietenia mahogani* ซึ่งสกัดด้วย Et_2O และ MeOH โดยใช้เครื่องสกัดแบบ Soxhlet ส่วนที่สกัดได้จากชั้น MeOH ใช้ $CHCl_3$ -MeOH -H_2O (13:7:4) เป็น solvent system และใช้ $CHCl_3$ ละลายสาร ใช้ Florisil ในการเตรียม column สำหรับการแยกสารและเพิ่มปริมาณ Me_2CO ในสารละลายผสมของ petroleum ether/ Me_2CO/ $CHCl_3$ ที่ใช้ในการแยกสารออกจาก column เก็บ fraction ซึ่ง elute ด้วย petroleum ether - Me_2CO- $CHCl_3$ (70:20:10) และใช้ flash chromatography ในการแยกสารให้บริสุทธิ์[6]



รูปที่ 2.13 รูปแสดงตัวอย่างโครงสร้างของ polyacetylene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rosabel Segura-Correa และผู้ร่วมงานได้ค้นพบสาร four new tetranortriterpenoids , humilinolides จากเมล็ดของ *Swietenia humilis* ซึ่งสกัดจากชั้น MeOH และศึกษาโครงสร้างของสารทั้ง 4 ตัวด้วยวิธีทาง spectroscopic สารที่ค้นพบสามารถนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในสัตว์

แม้ว่าจะมีตัวยาเพียงจำนวนเล็กน้อยที่ผ่านการทดสอบต่างๆ จนกระทั่งนำมาใช้เป็นยาได้ก็ตาม แต่จากการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียเป็นจำนวนมากนี้ก็แสดงให้เห็นว่า การค้นพบตัวยาใหม่ๆ จากสมุนไพรโดยอาศัยประวัติการใช้พื้นบ้านเป็นเกณฑ์นั้น เป็นแนวทางการศึกษาที่มีโอกาสบรรลุเป้าหมายได้ในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. Ethyl Acetate
2. Methanol
3. Hexane
4. Butanol
5. Silica Gel เบอร์ 7729
6. Silica Gel เบอร์ 7734
7. Magnesium Sulfate
8. Acetic Acid
9. น้ำกลั่น
10. Anisaldehyde
11. Absolute Ethanol
12. Conc.Sulfuric Acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. TLC Tank
2. TLC Plate (Silica Gel on Aluminium เบอร์ 5554)
3. คอลัมน์
4. Rotary Evaporator
5. Aspirator
6. Magnetic Stirrer/Heat
7. ชุดปั๊ม
8. ขวดรูปชมพู่
9. ขวดก้นกลม
10. หลอดทดลอง
11. กระบอกตวง
12. ปิเปต
13. บีกเกอร์
14. Vial
15. หลอดหยด
16. แท่งแก้วคน
17. ช้อนตักสาร
18. กรวยกรอง
19. กระดาษกรอง
20. Aluminium Foil
21. แผ่นกระจก
22. Stand and Clamp
23. UV Spectrometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

1. นำเปลือกรากและรากของต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่ มาตากแดดให้แห้งและบดจนละเอียด

2. นำเปลือกรากและรากที่บดละเอียดมาสกัดโดยวิธีการแช่ลงในตัวทำละลาย hexane และ methanol เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3. กรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย นำชั้นตัวทำละลายมาระเหยโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator เรียกส่วนนี้ว่า crude extract

4. แบ่ง crude extract ที่ได้ส่งทดสอบฤทธิ์ทางยา ดังต่อไปนี้

4.1 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาเลเรีย

4.2 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านไวรัสเริม

4.3 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง

5. การหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆด้วย Thin Layer Chromatography (TLC)

6. แยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography

7. วิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร ตรวจสอบโดยใช้ IR, NMR, MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีทดลอง

3.3.1 การเตรียม Crude Extract ในแต่ละชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ

1. นำรากของต้นมะฮอกกะนีใบใหญ่แห้งบดละเอียด หนัก 602.9 กรัม แช่ลงใน hexane เป็นเวลา 1 สัปดาห์ คนอย่างสม่ำเสมอทุกวัน วันละ 15 นาที

2. ค่อยๆรินกรองเอาสารสกัดออก บีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด

3. ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator วิธีนี้จะเป็นการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันลงเกือบเป็นสูญญากาศ

4. ชั่งน้ำหนักของ crude extract (ชั้น hexane) เท่ากับ 2.3 กรัม ให้รหัสเป็น SM(R)Crude/Hexane

5. นำกากที่ได้จากการกรองในข้อ 2 มาผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ใน methanol เป็นเวลา 1 สัปดาห์

6. ทำตามวิธีทำจากข้อ 3-4 ได้น้ำหนักของ crude extract (ชั้น methanol) เท่ากับ 25.6 กรัม ให้รหัสเป็น SM(R)/Crude/Methanol

ในส่วนของเปลือกรากจะสกัดโดยการแช่ใน hexane และ methanol (วิธีทำเหมือนกับข้อ 3-4)ได้น้ำหนัก crude extract ดังต่อไปนี้

ชั้น hexane = 1 กรัม ให้รหัสเป็น SM(BR)/crude/hexane

ชั้น methanol = 27.8 กรัม ให้รหัสเป็น SM(BR)/crude/methanol

3.3.2 การหา Solvent System ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี Column Chromatography

1. นำ crude extract จากชั้น methanol มาใส่ vial แล้วละลายด้วย methanol

2. เนื่องจากสารที่แยกจากชั้น methanol สารส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีความเป็นขั้วมาก ดังนั้นตัวทำละลายที่เลือกใช้จึงค่อนข้างจะมีความเป็นขั้วมาก จึงเลือก methanol กับ ethyl acetate เทียบอัตราส่วนเพื่อหา solvent system ที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตัดแผ่น TLC Plate ขนาด 2x7 cm ทำการ spot crude extract ที่ละลายแล้วลงบนแผ่น 2 จุด โดยแต่ละจุดจะจุดให้ความเข้มต่างกัน

4.เตรียม TLC tank โดยมีกระดาษกรองวางข้างใน tank และเตรียมแผ่นกระจกไว้ปิด

5. ทดสอบอัตราส่วน solvent ที่ค่าต่างๆ โดยเริ่มจาก 20% methanol : 80% ethyl acetate แล้วจึงลดหรือเพิ่มปริมาณของ methanol กับ ethyl acetate ขึ้นอยู่กับการแยกสารใน crude extract บนแผ่น TLC

6. ในกรณีที่สารเป็นทางยาว จะใช้ butanol หรือ acetic acid 2-3 หยด ผสมลงใน solvent เพื่อช่วยให้สารแยกจากกันดีขึ้น

7. จุ่มแผ่น TLC ลงใน TLC tank ตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับ solvent front ที่กำหนดไว้

8. ดูผลการทดลองที่เกิดขึ้นว่าสารแยกเป็นอย่างไร ถ้าสารสามารถแยกเห็นเป็นจุดๆ อย่าง ชัดเจน แสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็น solvent system ที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่พบจะทำการเพิ่มหรือลดปริมาณนั้นๆจนกว่าจะได้ระบบที่เหมาะสม

9. นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

10. นำไปย้อมด้วย developing solvent โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจก นำสำลีชุบ developing solvent ป้ายให้ทั่วแผ่นนำไปอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของจุดของสารที่สนใจ

11. ใช้ solvent system ที่หาได้นำไปใช้ในการแยกสารโดยวิธี Column Chromatography

3.3.3 <u>การแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ โดยวิธี Column Chromatography</u>

ในวิธีทดลองได้อธิบายถึงการแยกสารในชั้น methanol โดยการแยกสารในชั้น hexane ใช้วิธีการเช่นเดียวกัน จากนั้นจึงใช้ solvent system ที่เหมาะสมของสารแต่ละชั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เตรียม column ใช้ stand และ clamp จับ column ให้ตั้งฉากกับพื้น

2. ทำการ pack column โดยใช้ Silica Gel เบอร์ 7734 หรือ silica gel เบอร์ 7729

3. ชั่ง silica gel 60 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วใช้ ethyl acetate ผสม silica gel คนให้เข้ากัน

4. ใช้สำลีอุด column หยดข้างๆ column ด้วย ethyl acetate ให้ทั่วชุ่มสำลี

5. เท silica gel ใน ethyl acetate ลงใน column ปรับผิวหน้าของ silica gel ให้เรียบ โดยเคาะข้าง column เบาๆ

6. ใส่ ethyl acetate ใน column ให้เพิ่มสูงขึ้นอีกเล็กน้อย โดยให้ผิวหน้าของ silica gel ใน Column เรียบ และไม่มีรอยแตกหรือฟองอากาศอยู่ จากนั้นใส่ anhydrous $MgSO_4$ ลงใน column เพื่อป้องกันผิวหน้าของ silica gel ให้เรียบอยู่เสมอ

7. เตรียมสารที่ต้องการแยก ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 ml ละลายด้วย methanol เพียงเล็กน้อย จากนั้นใส่ silica gel เบอร์ 7734 คนให้เข้ากัน (ถ้ายังชุ่มด้วย methanol ให้ทำการระเหยตัวทำละลายออกไป) ใส่ crude extract ผสม silica gel ลงใน column ให้หมดโดยไม่ต้องทำการกลั้วขวดก้นกลมที่ใช้ด้วย methanol

8. ล้าง column ข้างๆ ให้สะอาดและให้ ethyl acetate ที่อยู่ใน column เหลืออยู่เหนือ crude extract น้อยที่สุด

9. ใช้ ethyl acetate ประมาณ 100 ml เป็นตัว eluent ก่อนแล้วค่อยเพิ่มความมีขั้วของสารละลายอย่างช้าๆ และต่อเนื่องเพื่อให้สารที่ต้องการแยกออกมาโดยการเพิ่มปริมาตรของ methanol เก็บสารละลายที่ออกจาก column ด้วยหลอดทดลองประมาณครึ่งหลอด จดหมายเลขหลอดที่ใช้ตามลำดับ

10. เมื่อเก็บสารละลายได้ในแต่ละหลอด ทำการตรวจสอบสารที่ต้องการออกจาก column ด้วย Thin Layer Chromatography โดยเทียบกับ crude extract ถ้าสารที่ต้องการยังไม่ออกมา อาจจะต้องทำการเพิ่มขั้วของสารละลายอีกโดยเพิ่มเป็น 1% ของ methanol ใน ethyl acetate และตรวจสอบทุกหลอดด้วย UV และ developing solvent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. เมื่อทราบว่าสารที่ต้องการแยกออกมาแล้ว (ตรวจสอบจาก TLC) จดบันทึกว่าเริ่มแยกออกมาจากหลอดที่เท่าใดและออกมาหมดเมื่อหลอดที่เท่าใด

12. ผสมหลอดที่มีสารอยู่ลงในขวดก้นกลมโดยใช้ ethyl acetate ล้างข้างหลอดทุกหลอดผสมลงไปด้วยและนำไปทำการระเหยตัวทำละลายออก

13. เมื่อได้สารบริสุทธิ์อยู่ในขวดก้นกลม ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ออกมาและเก็บใส่ตู้เย็นเพื่อนำไปตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้างของสารต่อไป

3.3.4 การระเหยตัวทำละลาย

1. ใส่สารสกัดที่ต้องการระเหยตัวทำละลายลงในขวดก้นกลมประมาณครึ่งขวดก้นกลม

2. นำไปติดตั้งกับเครื่อง Rotary Evaporator โดยตั้งอุณหภูมิที่ 30-40 องศาเซลเซียส

3. เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปแล้วในขวดก้นกลมจะเหลือแต่สารสกัดที่ต้องการ ถ้าสารสกัดที่ต้องการระเหยยังเหลือให้ใช้วิธีเดิมโดยใส่ในขวดก้นกลมใบเดิมจนกระทั่งสารสกัดที่ต้องการหมดจึงนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาเปอร์เซนต์ ผลผลิตสารที่ได้ออกมา และเก็บสารที่ได้ไว้วิเคราะห์ต่อไป

3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy เพื่อหาหมู่ฟังก์ชันนัลใช้ NMR spectroscopy เพื่อหาโครงสร้างและใช้ mass spectroscopy เพื่อหามวลโมเลกุลของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การเตรียม developing solvent

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Anisaldehyde 2 ml
2. conc.sulfuric acid 3 ml
3. absolute ethanol 90 ml
4. น้ำกลั่น 2 ml
5. ปิเปต
6. ขวดแก้ว ขนาด 150 ml
7. แท่งแก้วคน
8. aluminium foil

วิธีเตรียม

1. ปิเปตสารตามปริมาตรที่กำหนดให้ โดยใส่ conc.sulfuric acid เป็นตัวสุดท้าย
2. คนสารละลายให้เข้ากัน
3. ใช้ aluminium foil หุ้มขวดแก้วโดยไม่ให้สารละลายที่เตรียมได้โดนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการวิจารณ์

4.1 ศึกษาการหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ เพื่อนำ ไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี column chromatrography

4.1.1 <u>ผลการหา solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่าง ๆ</u>

เมื่อนำ crude extract จากชั้น methanol มาทำการ development ด้วย TLC โดยทำการสุ่มค่า solvent system ต่างๆ พบว่า solvent system ที่เหมาะสมคือ solvent system ที่สามารถแยกได้อย่างเด่นชัด ดังแสดงในตารางที่ 4.1

<u>ตารางที่ 4.1</u> แสดงค่า solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่างๆ

crude extract	solvent system
ชั้น methanol	5% methanol 95% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
ชั้น hexane	5% ethyl acetate 40% dichloromethane 55% hexane 3 หยดของ butanol

4.1.2 <u>ผลของการเรืองแสงต่อ UV spectrophotometer</u>

เมื่อนำ crude extract นำไปย้อมด้วย developing solvent มาทดสอบผลการเรืองแสงต่อแสง UV ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 4.2

<u>ตารางที่ 4.2</u> แสดงผลการเรืองแสงต่อแสง UV ของ crude extract ในชั้นต่างๆ

crude extract	**ผลการเรืองแสงต่อแสง UV**
ชั้น methanol	พบจุดเรืองแสง 1 จุด
ชั้น hexane	ไม่พบจุดเรืองแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 **ผลการแยก** crude extract **โดย** TLC solvent system **ที่เหมาะสม**

นำแผ่น TLC นั้นย้อมด้วย developing solvent และอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นการแยกของ crude extract ได้อย่างเด่นชัด ดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 รูปถ่ายแสดงผลการแยกของ crude extract ในชั้นต่างๆ ด้วย TLC โดยผ่านการย้อมสีด้วย developing solvent จากรูป หมายเลข 1 คือ crude extract ชั้น methanol หมายเลข 2 คือ crude extract ชั้น hexane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบ crude extract ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาและค้นคว้า ได้มีการนำมะฮอกกะนีใบใหญ่มาใช้ในการรักษาโรค ดังนั้น การวิจัยจึงสนใจศึกษารากและเปลือกรากของมะฮอกกะนีใบใหญ่ที่มีผลต่อต้านมาลาเรีย โดยทดสอบ crude extract ที่สกัดได้ในชั้น methanol และ hexane ตรวจสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาเลเรียของเปลือกรากและรากไม้มะฮอกกะนีใบใหญ่

Code	Compound/MW/ weight (g)	Dissolve in	EC50 (g/ml)
1. SM(BR) hex	0.0067	DMSO	$>1.0x10^{-4}$
2. SM(BR)MeOH	0.0047	DMSO	$1.0x10^{-5}$
3. SM (R)MeOH	0.0109	DMSO	$1.2x10^{-5}$
4. SM (R)hex	0.0053	DMSO	$8.0x10^{-6}$

จากผลที่ได้พบว่ารากไม้มะฮอกกะนีใบใหญ่ที่สกัดได้ในชั้น hexane มีผลต่อต้านฤทธิ์มาลาเรียมากที่สุด ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการแยกสารที่อยู่ในรากไม้มะฮอกกะนีใบใหญ่ที่สกัดได้ในชั้น hexane เพื่อวิเคราะห์และคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของสารที่อยู่ในชั้นนี้

ในขั้นต้นนี้ทราบว่า crude extract ในชั้น hexane มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียมากที่สุด ในขั้นตอนต่อไปศึกษาว่า สารประกอบใดใน crude extract ที่มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย เราจึงมุ่งเน้นที่จะทำการแยก crude extract โดยวิธี column chromatography เพื่อแยกสารที่ต้องการให้มีความบริสุทธิ์ และนำสารที่แยกได้ในแต่ละชนิดนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ โดยวิธี column chromatography

ผลการทดลองในส่วนนี้กล่าวถึงการแยกสารใน crude extract ของชั้นต่างๆ ที่ได้มีการหา solvent system อย่างเหมาะสมในการแยก crude extract โดยอาศัยเทคนิค column chromatography พบว่า solvent system ที่ใช้ในแต่ละชั้นของสารละลายจะไม่เหมือนกัน และจำนวนสารที่ต้องการแยกก็ไม่เท่ากันด้วย

4.3.1 crude extract ชั้น methanol

จากการตรวจสอบด้วย TLC ในชั้นนี้พบสารที่น่าสนใจเพียง 1 ตัวเท่านั้น pack column ด้วย silica gel เบอร์ 7734 และแยกด้วย solvent system ที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่าค่า solvent system ที่เหมาะสม โดยเก็บใส่หลอดทดลอง และตรวจสอบสารที่ต้องการแยกออกจาก column โดยค่อย ๆ เพิ่มความเป็นขั้วให้กับ solvent system ทีละน้อยโดยมีค่าความเป็นขั้วน้อยกว่าค่า solvent system ที่เหมาะสม เพราะจะทำให้สารที่แยกออกมามีความชัดเจน ไม่เร็วจนเกินไป และได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยสารละลายที่เหมาะสมแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography

รายละเอียดที่ใช้ในการแยก	ลักษณะ
silica gel ที่ใช้ pack column	เบอร์ 7734
solvent system ที่เหมาะสม	5% methanol 95% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
สารใน crude extract ที่ต้องการแยก	1 ตัว

เริ่มต้นเก็บสารละลายที่ไหลผ่าน column ออกมา ใส่หลอดทดลอง และทุกหลอดต้องตรวจสอบด้วย TLC และบันทึก solvent system ที่ใช้ในการแยกในแต่ละหลอด เพื่อตรวจว่าสารที่ออกจาก crude extract มี solvent system ที่เหมาะสมที่สุด โดยบันทึกเลขที่และจำนวนของหลอด ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดง solvent system ที่ใช้ในการเก็บสารในแต่ละหลอดของการแยก crude extract ชั้น methanol

solvent system ที่ใช้	ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ
100% ethyl acetate	1-8

จากการตรวจสอบด้วย TLC ในหลอดทดลองที่เก็บสารละลายแต่ละหลอด พบว่าสารที่ต้องการแยกออกมามีดังนี้

สารตัวที่ 1 solvent system สารเริ่มออก 100% ethyl acetate

ช่วงหลอดทดลองที่เก็บสารที่ต้องการ หลอด 2-4

จำนวนหลอดทดลองที่มีสารอยู่ 3 หลอด

หลังจากแยกสารใน crude extract ออกมาหมดแล้ว ทำการรวมสารละลายแต่ละ fraction เข้าด้วยกัน โดยเก็บเฉพาะช่วงหลอดทดลองที่มีสารที่ต้องการอยู่ และนำไปทำการระเหยตัวทำละลายออก

การแยกสารจาก crude extract ในชั้น methanol ด้วย column chromatography พอสรุปคร่าว ๆ ได้ว่า

ตารางที่ 4.6 แสดงผลสรุปการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography

สารแยกออกมา	1 ตัว
solvent system ที่เหมาะสม	5% methanol 95% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
solvent system ที่สารเริ่มออกจาก column	100% ethyl acetate
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็งเป็นผลึก สีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 crude extract ชั้น hexane

จากการตรวจสอบด้วย TLC ชั้น hexane พบสารทั้งหมด 4 ตัว โดยใช้ column silica gel เบอร์ 7729 อาศัยปั๊มช่วยให้สารละลายไหลผ่านออกจาก column เร็วขึ้น เก็บสารละลายที่ออกจาก column ใส่หลอดทดลอง บันทึก solvent system ที่ใช้ในแต่ละช่วงของหลอดทดลอง และตรวจสอบว่า สารใน crude extract แต่ละตัว ออกมาที่ค่า solvent system ที่เหมาะสม โดยตรวจจาก TLC รายละเอียดที่ใช้ในการแยกแสดงในตารางที่ 4.7 และ 4.8

ตารางที่ 4.7 แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography

รายละเอียดที่ใช้ในการแยก	ลักษณะ
silica gel ที่ใช้ pack column	เบอร์ 7729
solvent system ที่เหมาะสม	5% ethyl acetate 40% dichlorometane 55% hexane 3 หยดของ butanol
สารใน crude extract ที่ต้องการแยก	4 ตัว

ตารางที่ 4.8 แสดง solvent system ที่ใช้ในการเก็บสารในแต่ละหลอดของการแยก crude extract ชั้น hexane

solvent system ที่ใช้	ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ
12% dichlorometane 88% hexane	1-2
16% dichlorometane 84% hexane	3-4
20% dichlorometane 80% hexane	5
30% dichlorometane 70% hexane	6
40% dichlorometane 60% hexane	7-13
1% ethyl acetate 40% dichlorometane 59% hexane	14-17
2% ethyl acetate 40% dichlorometane 58% hexane	18-19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

solvent system ที่ใช้	ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ
3% ethyl acetate 40% dichlorometane 57%hexane	20-21
4% ethyl acetate 40% dichlorometane 56%hexane	22-40

เมื่อเก็บสารลงในหลอดทดลองแล้วนำมาตรวจสอบด้วย TLC สารต่าง ๆ จะออกมาที่ค่า solvent system แตกต่างกัน มีผลแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการแยกสารของ crude extract ชั้น hexane ด้วยวิธี column chromatography

สารตัวที่	solvent system มีสารเริ่มออก	หลอดทดลองมีสารออก	จำนวนหลอดทดลอง
1	30%dichlorometane 70% hexane	7-11	5
2	4% ethyl acetate 40%dichlorometane 56% hexane	24-26	3
3	4% ethyl acetate 40%dichlorometane 56% hexane	27-30	4
4	4% ethyl acetate 40%dichlorometane 56% hexane	31-38	8

เมื่อแยกสารเสร็จจาก column แล้วทุกตัว ทำการรวม fraction โดยจะมีทั้งหมด 4 fraction ซึ่งต้องรวมให้สารที่แยกออกมาแต่ละตัว มีความบริสุทธิ์สูงมากที่สุด โดยแยกใส่ขวดก้นกลม 4 ขวด และนำไประเหยตัวทำละลายออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำ crude extract ชั้น hexane ที่มีสารอยู่ทั้งหมด 4 ตัว มาแยกด้วย column chromatography อีกครั้ง โดยใช้ solvent system ที่เหมาะสมในการแยก แต่ column ที่ใช้จะมีขนาดความยาวของ column สั้นกว่า column ที่ใช้แยก crude extract และทำการ pack column ด้วย silica gel เบอร์ 7729 โดยอาศัยปั๊มช่วยให้สารละลายไหลผ่านออกจาก column เร็วขึ้น และแยกสารลงในหลอดทดลอง ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC เช่นเดียวกันกับการแยก crude extract

สรุปได้ว่า การแยกสารจาก crude extract ในชั้น hexane ด้วย column chromatography ได้ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 แสดงผลสรุปการแยก crude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography

สารแยกออกมา	4 ตัว
solvent system ที่เหมาะสม	40% dichlorometane 55% hexane 5% ethyl acetate 2 หยดของ butanol

ตารางที่ 4.11 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก crude extract ชั้น hexane

สารตัวที่	ลักษณะของสาร
1	ของเหลวหนืด ไม่มีสี
2	ของเหลว ไม่มีสี
3	ของแข็ง สีขาว
4	ของแข็ง สีขาว

จากผลการทดลองขั้นนี้ จะได้สารทั้งหมด 5 ตัว โดยแยกจาก crude extract ที่อยู่ในชั้น methanol 1 ตัว และในชั้น hexane 4 ตัว สารที่ได้จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป สารแต่ละตัวจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น เป็นของแข็ง ของเหลวที่มีความหนืดสูง และมีสีต่างกัน เช่น สีขาว สีเหลือง เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงเลือกสารเพียงบางตัวไปทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลและโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค IR, NMR และ MS

ในชั้น methanol 1 ตัว ในชั้น hexane 4 ตัว ซึ่งกำหนดสารแต่ละตัวที่แยกเป็นรหัสตามผลการแยกได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงรหัสของสารที่แยกออกจาก crude extract ชั้นต่างๆด้วย column chromatography

crude extract	ลำดับก่อนหลังของสารที่แยกออกจาก column	รหัส
ชั้น methanol	สารตัวที่ 1	SM(R)(M)/1
ชั้น hexane	สารตัวที่ 1	SM(R)(H)/1
	สารตัวที่ 2	SM(R)(H)/2
	สารตัวที่ 3	SM(R)(H)/3
	สารตัวที่ 4	SM(R)(H)/4

นำสารทั้งหมดที่แยกด้วย column chromatography ในชั้น methanol 1 ตัว ในชั้น hexane 4 ตัว มาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลและโครงสร้างของสารแต่ละตัว

4.4.1 SM(R)(M)/1

นำชั้น methanol ที่มีเพียง 1 ตัว มาแยกด้วย column chromatography เพื่อทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้ silica gel เบอร์ 7729 และใช้ปั๊มช่วยในการแยก column ที่ใช้จะมีขนาดสั้นกว่าการแยกสารในขั้นตอนแรก solvent system ที่ใช้จะมีค่าความเป็นขั้วน้อยกว่าการแยกครั้งแรกเพื่อให้สารแยกออกมามีความบริสุทธิ์ที่สุด

น้ำหนักของสาร SM(R)(M) /1 = 0.2610 g

ลักษณะของสาร ของแข็งเป็นผลึก สีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

นำ SM (R)(M)/1 ตรวจสอบด้วย TLC และนำมาย้อมด้วย developing solvent สังเกตผลการเปลี่ยนสีเมื่อนำมาอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงสีของสาร ส้ม→น้ำตาลแดง

ค่า R_f ของสาร = 0.51

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

SM(R)(M)/1 เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมา ดังรูปที่ 4.2 นำมาเทียบค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

IR (neat) : ν_{max} = 3370 , 1607 , 1518-1464 , 1139 cm^{-1}

จากค่า ν_{max} คาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3370	O-H
1607	C=C Aryl conjugate
1518-1464	C=C ของวงแหวน aromatic
1139	C-O

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

SM(R)(M)/1 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR ได้ NMR สเปคตรัมดังรูปที่ 4.3 เมื่อใช้ CD_3OD/TMS เป็น solvent สัญญาณค่า ^1H chemical shift ที่สนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

δ (1.2 ppm) เป็นของ $-CH_3$ δ (2.1 ppm) เป็นของ $H_3C-C=O$ δ (2.5-3.0 ppm) เป็นของ $-O-CH_3$ และδ (3.2-4.5 ppm) เป็นของ CH_2-CH_2 δ (5.0 ppm) เป็นของ MeOH δ (6.0 ppm) เป็นของ CH=CH δ (6.7-7.0 ppm) เป็นของ Ph-H

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C chemical shift เมื่อใช้ CD_3OD เป็น solvent จะทราบถึงจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะเฉพาะของคาร์บอน ดังรูปที่ 4.4

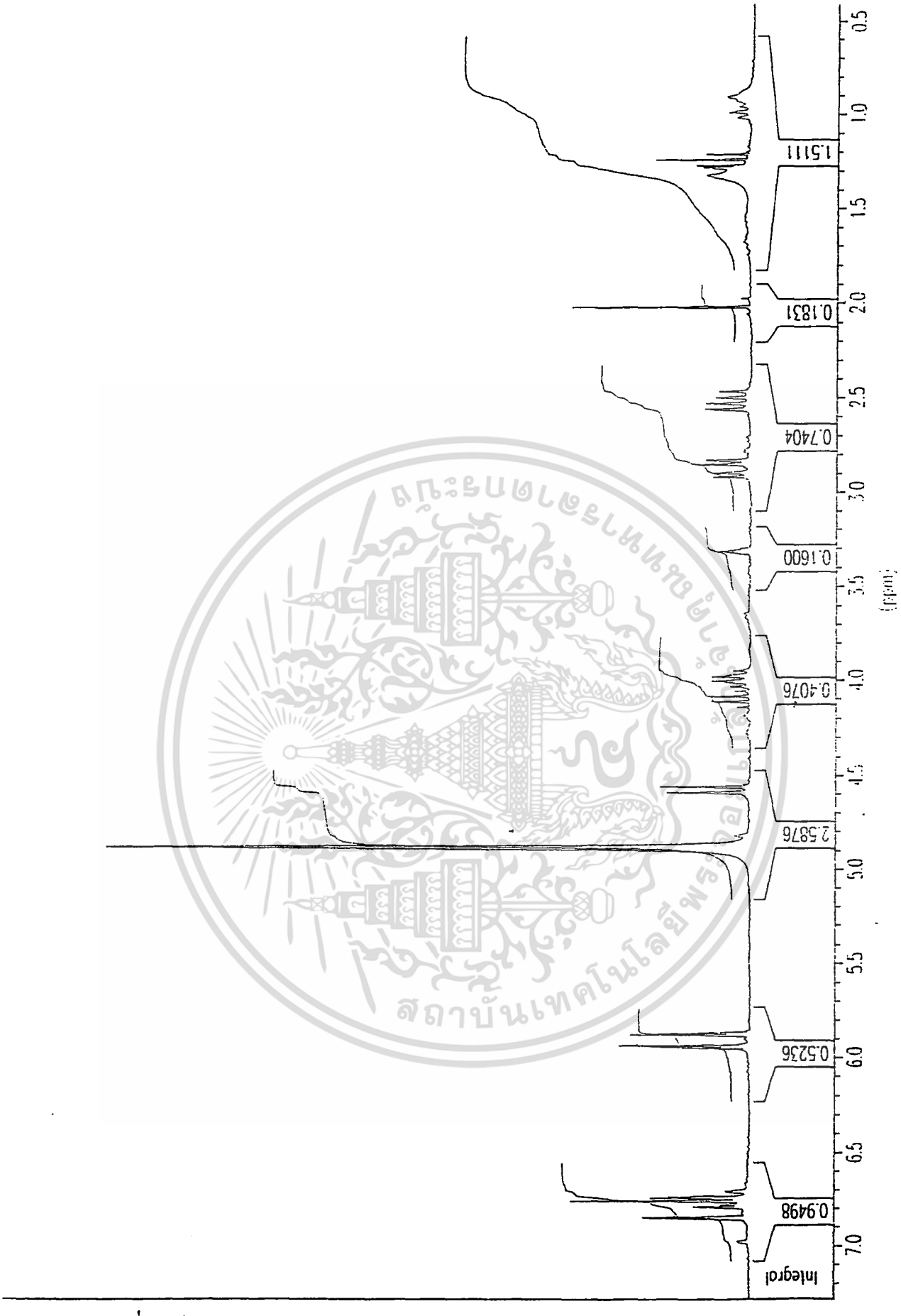
จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่ δ 30 , 69 , 83 , 95 , 97 , 102 , 115 , 116 ,120 , 132 , 148 , 157 , 158 ppm

δ (30 ppm) เป็นของ $C-CH_3$ δ (69 ppm) เป็นของ CH-O δ (83 , 95 , 97 ppm) เป็นของ C-O δ (102 , 115-116 , 120 ppm) เป็นของ C=C aromatic δ (132 , 148 , 157-158 ppm) เป็นของ C=C alkene

จาก spectrum ทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆได้ว่า สาร SM(R)(M)/1 น่าจะมีจำนวนคาร์บอน 13 ตัว มีวงแหวน aromatic และหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่และหมู่คาร์บอนิล

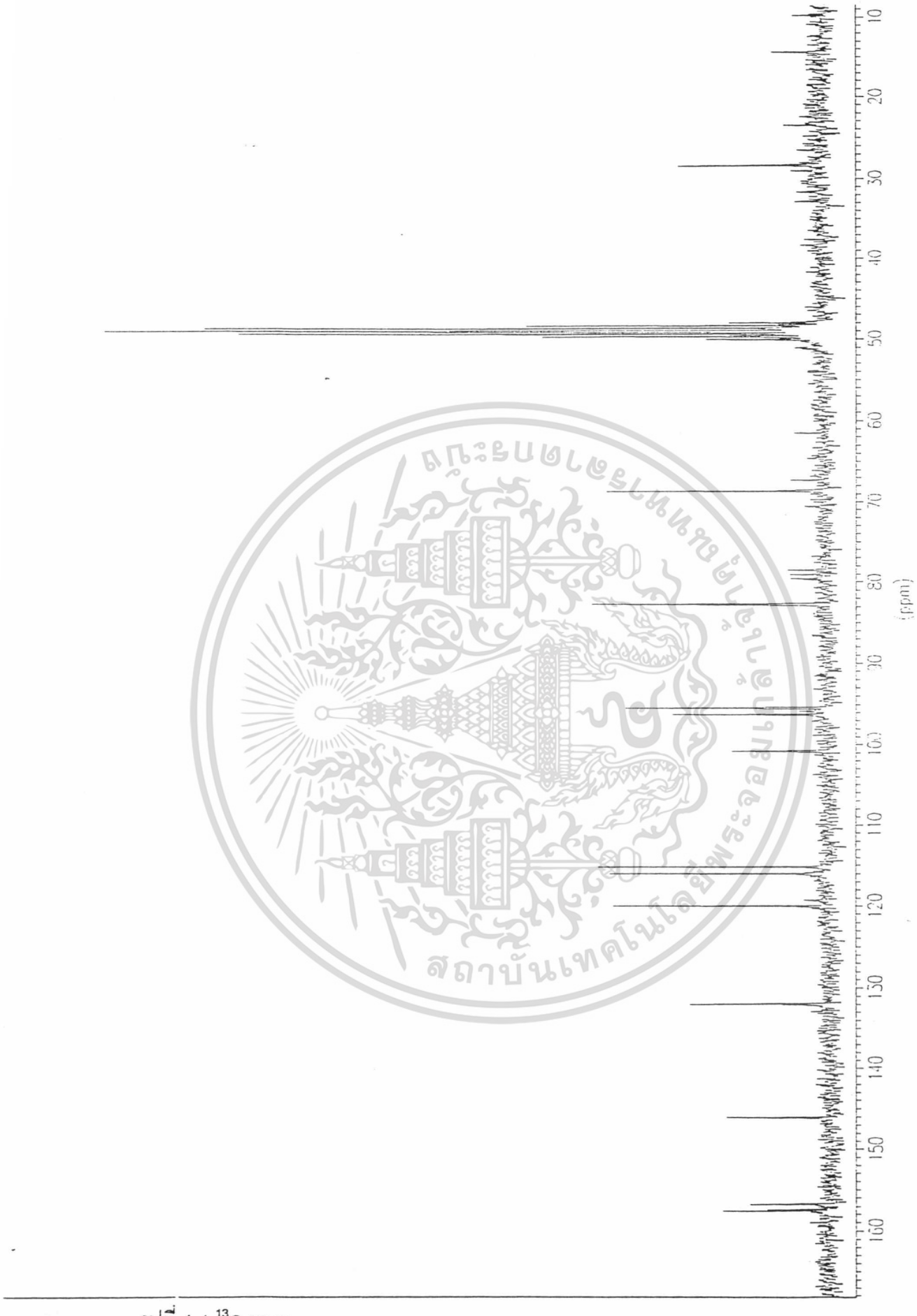
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 IR spectrum ของ SM(R)(M)/1



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รูปที่ 4.3 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(M)/1



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รูปที่ 4.4 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(M)/1

4.4.2 SM(R)(H)/1

นำชั้น hexane ที่แยกสารได้ 4 ตัว โดยนำมาทำให้สารมีความบริสุทธิ์โดยนำ SM(R)(H)/1 fraction แรกมาระเหยสารละลาย ไม่ต้องนำมาแยกด้วย column chromatography เนื่องจากสารมีค่า R_f มากกว่าสารตัวอื่นที่อยู่ในชั้น hexane มาก ซึ่งแสดงว่า สาร SM(R)(H)/1 มีความบริสุทธิ์สูง

น้ำหนักของสาร SM(R)(H) /1 = 0.1781 g

ลักษณะของสาร ของเหลวหนืด ไม่มีสี คล้ายน้ำมัน

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

นำ SM (R)(H)/1 ตรวจสอบด้วย TLC และนำมาย้อมด้วย developing solvent สังเกตผลการเปลี่ยนสีเมื่อนำมาอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงสีของสาร เหลืองจาง→ม่วง

ค่า R_f ของสาร = 0.72

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

SM(R)(H)/1 เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมา ดังรูปที่ 4.5 นำมาเทียบค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

IR (neat) : ν_{max} = 3400 , 2900-2800 , 1750 , 1450-1400 cm^{-1}

จากค่า ν_{max} คาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ตารางแสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3400	O-H
2900-2800	$-CH_3$, $-CH_2-$
1750	C=O
1450-1400	C=C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

SM(R)(H)/1 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ได้ NMR สเปคตรัม ดังรูปที่ 4.6 เมื่อใช้ CD_3OD/TMS เป็น solvent สัญญาณค่า ^{1}H chemical shift ที่สนใจ δ (0.5-3.0 ppm) เป็นของ $-CH_2-$ δ (4.6-4.8 ppm) เป็นของ CH=CH

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C chemical shift เมื่อใช้ CD_3OD เป็น solvent จะทราบถึงจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะเฉพาะของคาร์บอน ดังรูปที่ 4.7

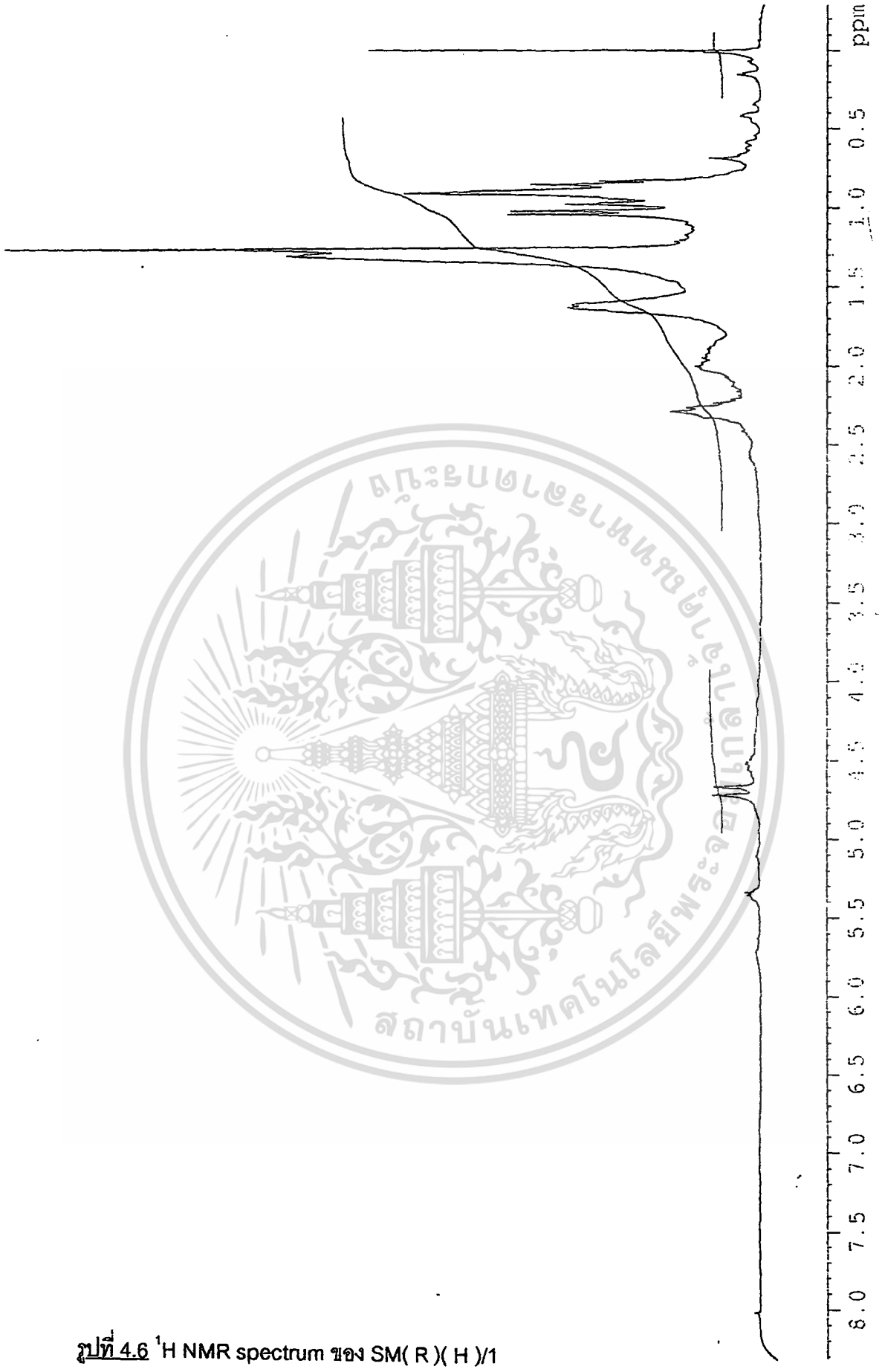
จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่ δ 12-55 76-78 , 79 , 106 , 130 ppm

δ (12-55 ppm) เป็นของ $C-CH_3$ และคาร์บอนของ impurity ที่ปนอยู่กับสาร δ (76-78 ppm) เป็นของ chloroform D δ (79 ppm) เป็นของ C-O δ (106 , 130 ppm) เป็นของ C=C alkene

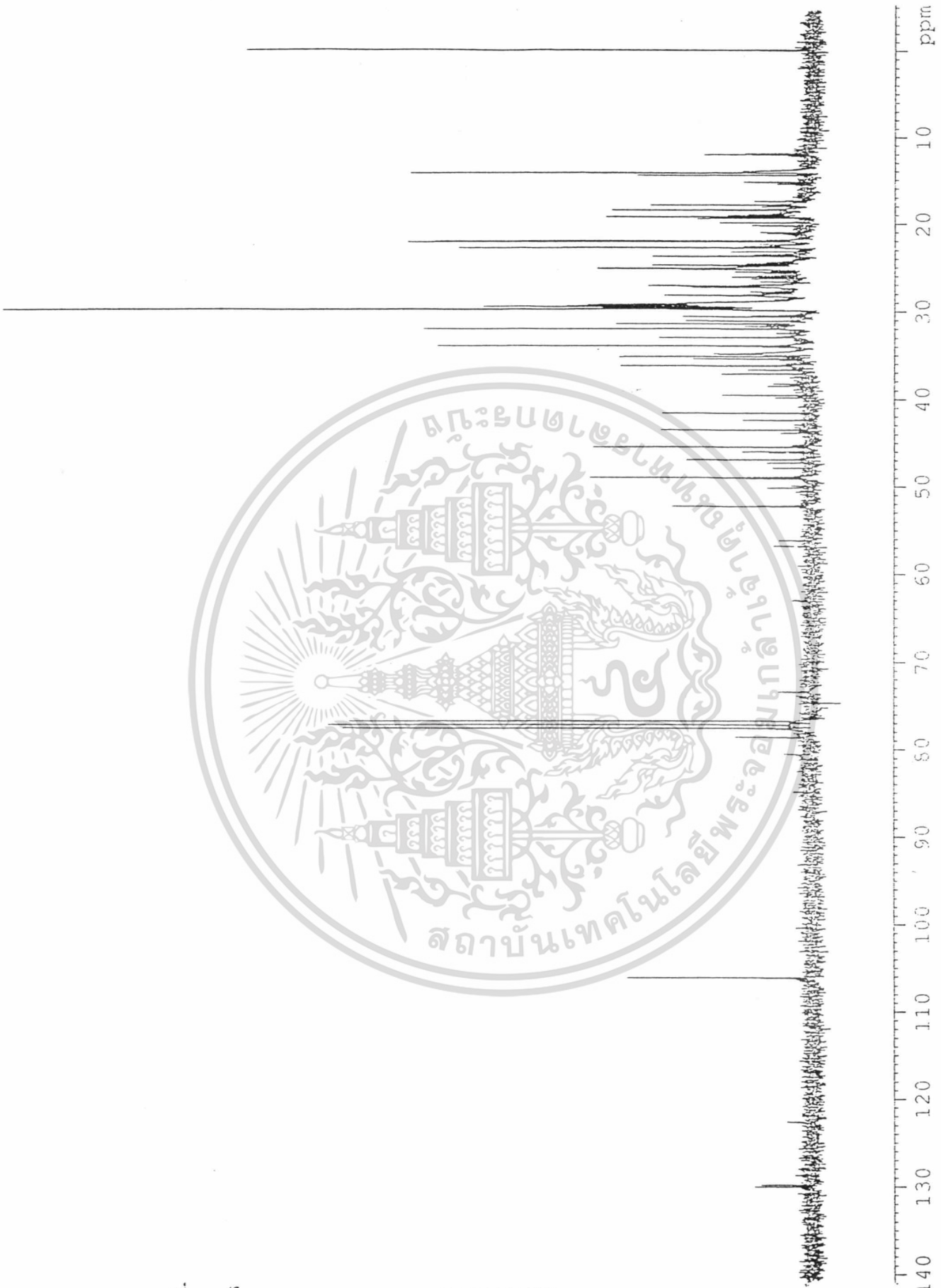
จาก spectrum ทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆได้ว่า สาร SM(R)(H)/1 น่าจะเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายโซ่ และมีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่และหมู่คาร์บอนิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 IR spectrum ของ SM(R)(H)/1



รูปที่ 4.6 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(H)/1



รูปที่ 4.7 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(H)/1

4.4.3 SM(R)(H)/2

- การทำให้สารมีความบริสุทธิ์

SM(R)(H)/2 fractionนี้ไม่สามารถทำให้สารบริสุทธิ์ได้ สารใน Fraction นี้ไม่นำมาตรวจสอบ:เพราะไม่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องได้

น้ำหนักของสาร SM(R)(H) /2 = 0.0443 g

ลักษณะของสาร ของเหลว ไม่มีสี

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

นำ SM (R)(H)/2 ตรวจสอบด้วย TLC และนำมาย้อมด้วย developing solvent สังเกตผลการเปลี่ยนสีเมื่อนำมาอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงสีของสาร ม่วง⟶ม่วงชมพู

ค่า R_f ของสาร = 0.37

4.4.4 SM(R)(H)/3

- การทำให้สารมีความบริสุทธิ์

SM(R)(H)/3 fractionนี้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography อีกครั้ง

น้ำหนักของสาร SM(R)(H) /3 = 0.0575 g

ลักษณะของสาร ของแข็ง สีขาว

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

นำ SM (R)(H)/3 ตรวจสอบด้วย TLC และนำมาย้อมด้วย developing solvent สังเกตผลการเปลี่ยนสีเมื่อนำมาอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงสีของสาร ม่วง⟶ม่วงเข้ม

ค่า R_f ของสาร = 0.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

SM(R)(H)/3 เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมา ดังรูปที่ 4.8 นำมาเทียบค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

IR (neat) : ν_{max} = 3130 , 2926 , 1732 , 1464-1377 cm^{-1}

จากค่า ν_{max} คาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3130	O-H
2926	$-CH_3$, $-CH_2-$
1732	C=O
1464-1377	C=C

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

SM(R)(H)/3 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR ได้ NMR สเปคตรัม ดังรูปที่ 4.9 เมื่อใช้ CD_3OD/TMS เป็น solvent สัญญาณค่า ^1H chemical shift ที่สนใจ δ (0.5-2.5 ppm) เป็นของ $-CH_2-$ δ (3.0-3.4 ppm) เป็นของ $-O-CH_3$ δ (4.6-4.8 , 7.3 ppm) เป็นของ CH=CH

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C chemical shift เมื่อใช้ CD_3OD เป็น solvent จะทราบถึงจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะเฉพาะของคาร์บอน ดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

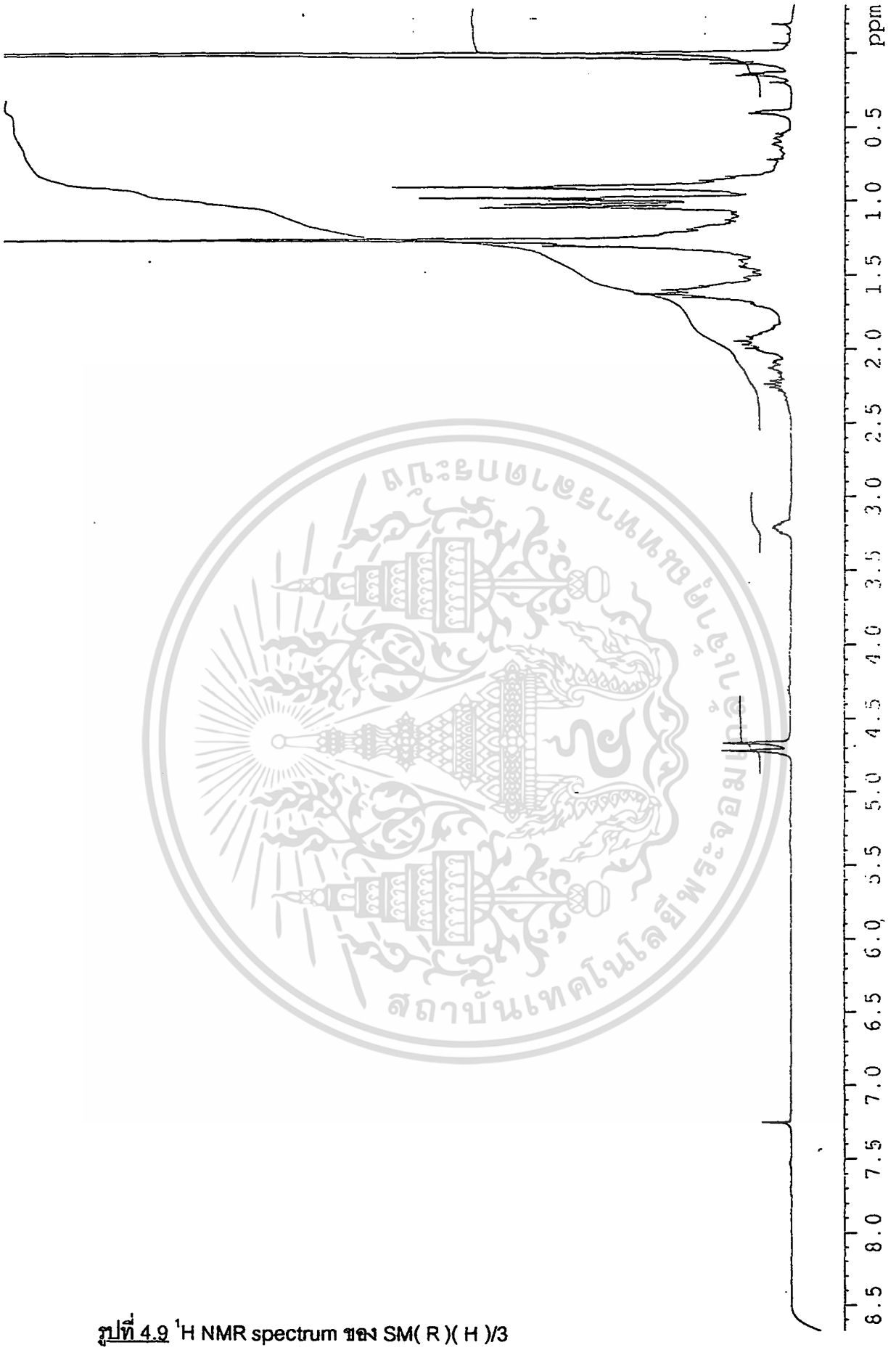
จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่ δ 15-53 70 , 76-78 , 107 ppm

δ (15-53 ppm) เป็นของ C-CH_3 และคาร์บอนของ impurity ที่ปนอยู่กับสาร δ (70 ppm) เป็นของ CH-O δ (76-78 ppm) เป็นของ chloroform D δ (107 ppm) เป็นของ C=C alkene

จาก spectrum ทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆได้ว่า สาร SM(R)(H)/3 น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับ SM(R)(H)/1 เนื่องจากสเปคตรัมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่และหมู่คาร์บอนิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 IR spectrum ของ SM(R)(H)/3



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รูปที่ 4.9 ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(H)/3

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

<u>รูปที่ 4.10</u> ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(H)/3

4.4.5 SM(R)(H)/4

- การทำให้สารมีความบริสุทธิ์

SM(R)(H)/4 fractionนี้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography อีกครั้ง

น้ำหนักของสาร SM(R)(H) /4 = 0.0378 g

ลักษณะของสาร ของแข็ง สีขาว

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

นำ SM (R)(H)/4 ตรวจสอบด้วย TLC และนำมาย้อมด้วย developing solvent สังเกตผลการเปลี่ยนสีเมื่อนำมาอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงสีของสาร ม่วงเข้ม→ม่วงเทา

ค่า R_f ของสาร = 0.21

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

SM(R)(H)/4 เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมา ดังรูปที่ 4.11 นำมาเทียบค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

IR (neat) : ν_{max} = 3447 , 2934 , 1717 , 1464-1378 cm^{-1}

จากค่า ν_{max} คาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3447	O-H
2934	$-CH_3$, $-CH_2-$
1717	C=O
1464-1378	C=C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

SM(R)(H)/4 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ได้ NMR สเปคตรัม ดังรูปที่ 4.12 เมื่อใช้ CD_3OD/TMS เป็น solvent สัญญาณค่า ^{1}H chemical shift ที่สนใจ δ (0.5-2.5 ppm) เป็นของ $-CH_2-$ δ (3.4-3.8 ppm) เป็นของ $-O-CH_3$ δ (4.6-4.8 , 5.3-5.6 , 7.3 ppm) เป็นของ CH=CH

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C chemical shift เมื่อใช้ CD_3OD เป็น solvent จะทราบถึงจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะเฉพาะของคาร์บอน ดังรูปที่ 4.13

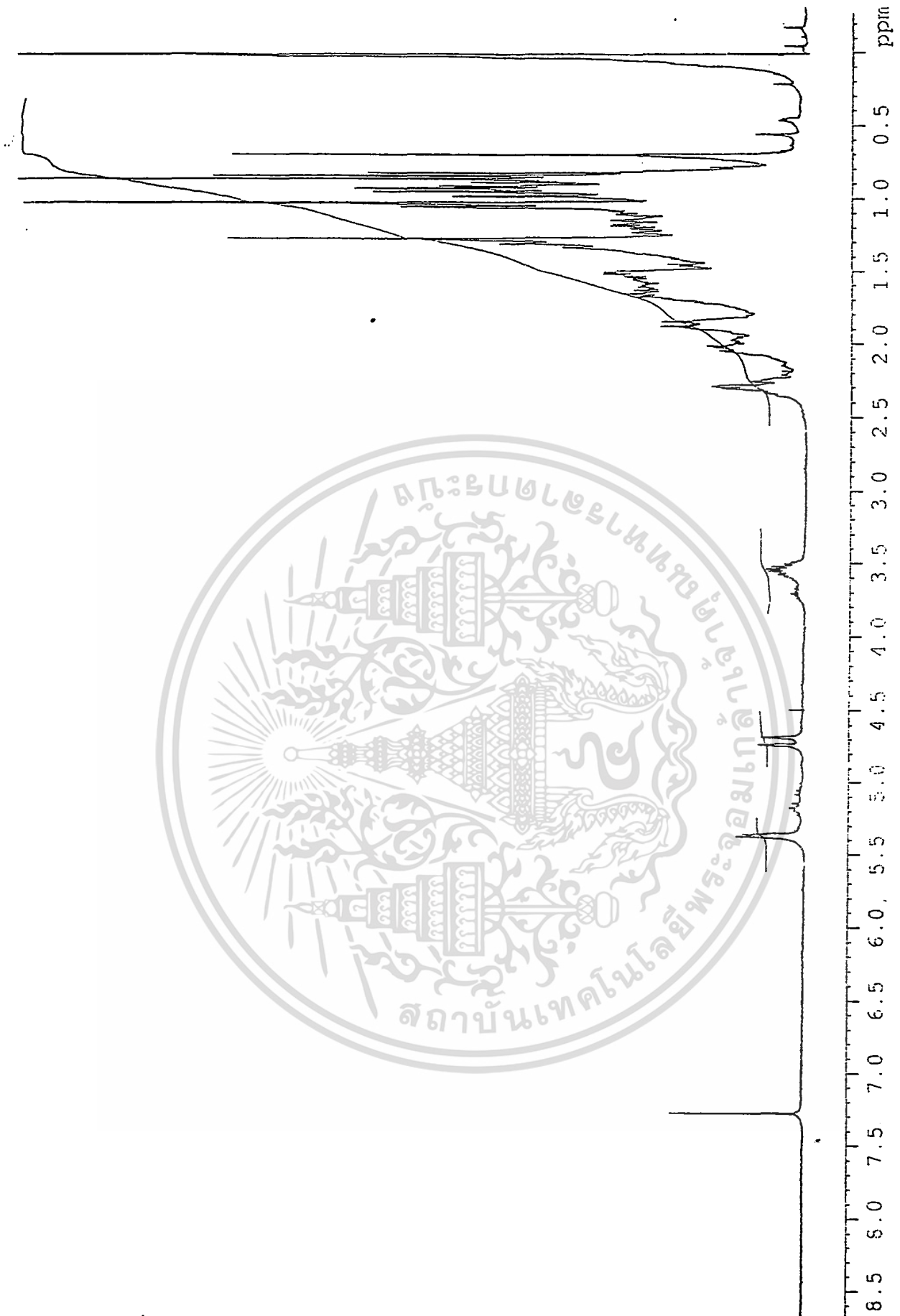
จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่ δ 10-60 69-72 , 76-78 , 106 , 121 , 141 ppm

δ (10-60 ppm) เป็นของ $C-CH_3$ และคาร์บอนของ impurity ที่ปนอยู่กับสาร δ (69-72 ppm) เป็นของ CH-O δ (76-78 ppm) เป็นของ chloroform D δ (106 , 121 , 141 ppm) เป็นของ C=C alkene

จาก spectrum ทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆได้ว่า สาร SM(R)(H)/4 น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับ SM(R)(H)/3 และ SM(R)(H)/1 เนื่องจากสเปคตรัมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่และหมู่คาร์บอนิล

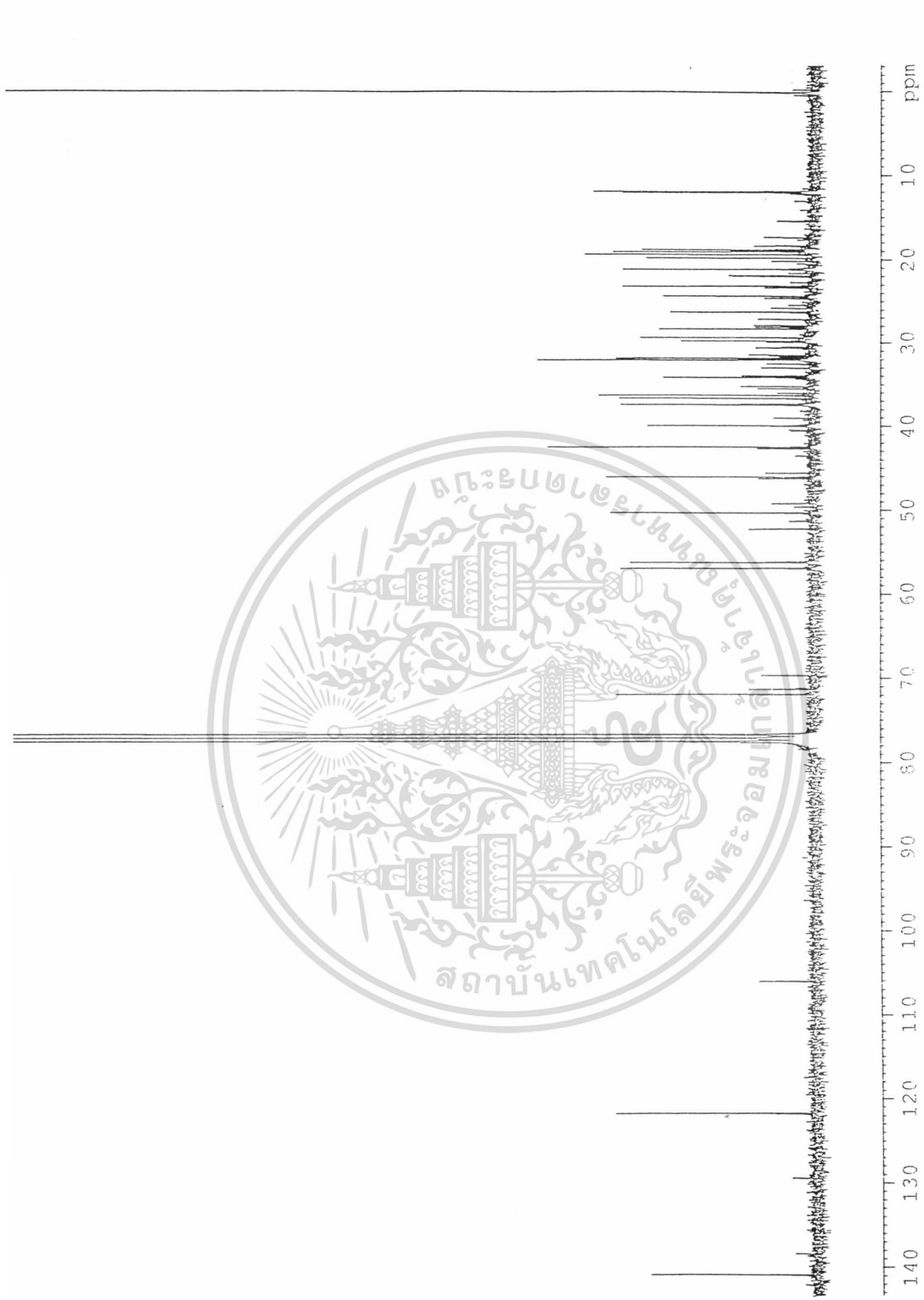
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.11 IR spectrum ของ SM(R)(H)/4



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

<u>รูปที่ 4.12</u> ^{1}H NMR spectrum ของ SM(R)(H)/4



รูปที่ 4.13 ^{13}C NMR spectrum ของ SM(R)(H)/4

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

5.1.1 รากไม้มะฮอกกะนีใบใหญ่ (*Swietenia Macrophylla King*) ที่สกัดในชั้น hexane มีฤทธิ์ต่อต้านมาเลเรียมากที่สุด

5.1.2 solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในทดสอบสารด้วย TLC และใช้เป็นแนวทางในการแยกสารสำคัญด้วย column chromatography

-ชั้น methanol ใช้ 5% methanol , 95% ethyl acetate และ 3 หยดของ butanol เป็น solvent system

-ชั้น hexane ใช้ 5% ethyl acetate , 40% dichloromethane , 55% hexane และ 2 หยดของ butanol เป็น solvent system

5.1.3 crude extract ซึ่งสกัดจากชั้น methanol และ hexane เมื่อนำมาทดสอบด้วย TLC พบว่า

-ชั้น methanol พบสารที่สำคัญ 1 ชนิด

-ชั้น hexane พบสารที่สำคัญ 4 ชนิด

ซึ่งสอดคล้องกับการใช้เทคนิค column chromatography ที่เก็บสารในชั้น methanol ได้ 1 ส่วน และในชั้น hexane ได้ 4 ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 ลักษณะของสารที่ได้

สารที่แยกได้ในแต่ละ fraction จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน

SM(R)(M)/1 ของแข็งเป็นผลึก สีเหลือง $R_f = 0.51$

SM(R)(H)/1 ของเหลวหนืด ไม่มีสี $R_f = 0.72$

SM(R)(H)/2 ของเหลว ไม่มีสี $R_f = 0.37$

SM(R)(H)/3 ของแข็ง สีขาว $R_f = 0.30$

SM(R)(H)/4 ของแข็ง สีขาว $R_f = 0.21$

5.1.5 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี

เนื่องจากในโครงงานพิเศษนี้ ไม่สามารถหาโครงสร้างของสารอย่างละเอียดได้ เพราะผลการศึกษาไม่เพียงพอ แต่สามารถคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัล และโครงสร้างได้เพียงคร่าวๆ

ผลการตรวจสอบด้วย IR , ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR

- SM(R)(M)/1

คาดคะเนได้ว่าสารมีหมู่คาร์บอนิลและพันธะคู่ (อัลคีน) โดยโครงสร้างคร่าวๆ น่าจะมีวงแหวน aromatic และจำนวนคาร์บอนอยู่ 13 ตัว

- SM(R)(H)/1

คาดคะเนได้ว่าสารมีหมู่คาร์บอนิลและพันธะคู่ (อัลคีน) โดยโครงสร้างคร่าวๆ น่าจะเป็นสายโซ่ยาว

- SM(R)(H)/2

ไม่สารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปีได้

- SM(R)(H)/3

คาดคะเนได้ว่าสารมีหมู่คาร์บอนิลและพันธะคู่ (อัลคีน) โดยโครงสร้างคร่าวๆ น่าจะเป็นสายโซ่ยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- SM(R)(H)/4

คาดคะเนได้ว่าสารมีหมู่คาร์บอนิลและพันธะคู่ (อัลคีน) โดยโครงสร้างคร่าวๆ น่าจะเป็นสายโซ่ยาว

สารที่แยกได้ในชั้นเฮกเซนได้สเปคตรัมที่มีลักษณะคล้ายกันทั้ง 3 ตัว ดังนั้น สารทั้ง 3 ตัวนี้ มีลักษณะโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันคล้ายกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สารสำคัญในรากไม้มะฮอกกะนี ชั้น hexane มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย ซึ่งมีสารสำคัญ 4 ตัว น่าจะทำการศึกษาถึงผลของสารสำคัญในแต่ละตัวที่มีฤทธิ์ต่อต้านมาเลเรีย

2. ในการแยกสารสำคัญ จะต้องหา solvent system ไม่ควรเกิดปฏิกิริยากับสารสำคัญ

3. การแยกสารสำคัญออกจาก column ควรเพิ่มความเป็นขั้วของ solvent system ที่ใช้ให้น้อยที่สุดและควรหยุดเพิ่มเมื่อสารสำคัญเริ่มออกจาก column เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารสำคัญ

4. ก่อนการนำสารไปวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิคทาง spectroscopy ควรทำให้สารนั้นมีความบริสุทธิ์ก่อน มีสารอื่นเจือปนในปริมาณที่น้อยที่สุด เช่น การนำสารมาทำ column chromatography อีกครั้ง การไล่สารละลายออกสารสำคัญ เป็นต้น

5. การหา solvent system ที่เหมาะสม ควรหาที่ความเป็นขั้วของสารละลายแตกต่างกันหลายๆค่า นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อให้ผลการแยกที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. นิจศิริ เรืองรังษี , พยอม ตันติวัฒน์ , พืชสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 1 . หน้า 1-9 , สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ , กรุงเทพฯ , 2534 .
2. วีณา จิรัจฉริยากุล , ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 1 . หน้า 99-136 , 318-329 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล , 2534.
3. ร.ศ. รัชนี ตัณฑะพานิชกุล , เคมีอินทรีย์ 2 พิมพ์ครั้งที่ 6 . หน้า 255-264 , 355-368 , 409-410 ,ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์ชวนพิมพ์ , กรุงเทพฯ , 2534 .
4. พรรณไม้ในสวนหลวง ร.9 , หน้า 97 , 2531 .
5. Chan , K.C. , Tang , T.S. , Toh , H.T. "Isolation of Swietenolide Diacetate from *SWIETENIA MACROPHYLLA*" Phytochemistry 15 . Department of University of Malay . Kuala Lumpur . Malaysia , England ,1976
6. Wakabayashi , N. , Samuel , L. Spencer , Waters , R.M. "A Polyacetylene from Hondurus Mahogany , *SWETENIA MAHAGONI*" Journal of Natural Products. 54(5) . (1991) : 1419-1421 .
7. Rosabel Segura-Correa , Rachel Mata , "New Tetranortriterpenoids from *SWIETENIA HUMILIS*" Journal of Natural Products . 56(9) . (1993) : 1567-1574 .

.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้