การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ

นาย สุพิชญ์ ปัญญาวัฒนพงศ์

นาย สุรชัย วรธรรมทองดี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2541

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33496
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study in The Chemical Constituents of The Natural Products

Mr. Supich Panyawattanapong

Mr. Surachai Worathomthongdee

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

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ
โดย	1. นาย สุพิชญ์ ปัญญาวัฒนพงศ์
	2. นาย สุรชัย วรธรรมทองดี
ภาควิชา	เคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์
	ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ผศ. นงนุช เภตรานุวัฒน์)
หัวหน้าภาควิชาเคมี
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(รศ.ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ)
ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์)
กรรมการ

(ดร. ตะวัน สุขน้อย)
กรรมการ

(ดร. พัชนี เจริญยิ่ง)
กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ

นักศึกษา นาย สุพิชญ์ ปัญญาวัฒนพงศ์

นาย สุรชัย วรธรรมทองดี

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์

ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

ต้นสีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.) เป็นไม้พื้นเมืองแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และได้มีการนำส่วนของ ใบ ลำต้น และราก มาใช้รักษาทางการแพทย์ จนมีการรายงานผลว่าสารสกัดจาก ใบ และกิ่ง ของต้นสีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.) มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม แฟลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งในโครงงานพิเศษนี้เป็นการหาส่วนประกอบทางเคมีของใบของต้นสีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.) ด้วยวิธีการสกัด (Extraction) ด้วยตัวทำละลาย และโครมาโตกราฟี (Chromatography) จากการทดลองพบว่า สารที่สกัดได้จากใบของต้นสีฟันคนทา (*Harrisania perforata* Merr.) ในตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาเลเรียได้ดี โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบในรูปของสารบริสุทธิ์เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study in The Chemical Constituents of The Natural Products
Name	Mr. Supich Panyawattanapong
	Mr. Surachai Worathomthongdee
Special Project Advisor	Asst.Prof.Dr. Theerawat Mongkolausawarat
	Dr. Patchanee Charoenying
Department	Chemistry
Academic	1998

Abstract

Harrisonia perforata Merr. is a native of Southeast Asia and its leaves, wood and root-bark have been use medicinally. Since the extracts of the leaves and the branches of *Harrisonia perforata* was reported an *in vitro* antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. In this research, we investigated the chemical which separated from the leaves of this plant by extraction with suitable solvent and chromatographic technique. It was found that the crude extract of the leaves of *Harrisonia perforata* Merr. in hexane, chloroform and methanol showed an antimalarial activity in good results. Attempt to isolate all of the compounds from crude extracts in puritical form was performed for testing antimalarial activity.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงงานพิเศษนี้ สำเร็จ และลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากการได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ การอำนวยความสะดวกและสิ่งที่เป็นประโยชน์ ของคณาจารย์และผู้เกี่ยวข้องแก่ผู้จัดทำ ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.พัชนี เจริญยิ่ง คอยเอาใจใส่ในโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างมาก ให้ความช่วยเหลือ ทั้งด้านการทดลอง ตลอดจน เอกสารที่จำเป็นสำหรับโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ สำหรับคำแนะนำ ความเอาใจใส่ ด้านการทดลองและการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ และ ดร. ตะวัน สุขน้อย อาจารย์คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ให้ความกรุณาแก้ไข โครงงานพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณ รัชดา จันทร์เพ็ญ และเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล ให้ความอนุเคราะห์ด้านการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย

ขอขอบพระคุณ อ. ประเสริฐ พัฒนาประทีป ให้ความอนุเคราะห์ด้านการทดสอบ FT-IR ในการตรวจหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

สุดท้ายกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ขอบคุณเพื่อนๆ สำหรับความรู้สึกดีๆ ที่มีให้ ตลอดจนรุ่นพี่ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและแนะนำแนวทางในการ โครงงานพิเศษฉบับนี้ รุ่นน้อง ที่ช่วยเหลือในด้านการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้และกำลังใจที่ดีที่สุด และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่านที่คอยอำนวยความมสะดวก ช่วยเหลือ และคำแนะนำมาโดยตลอด

นอกจากนี้บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือที่มิได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นาย สุพิชญ์ ปัญญาวัฒนพงศ์

นาย สุรชัย วรธรรมทองดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
อักษรย่อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดหวังว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี และหลักการ	
2.1 สมุนไพร	3
2.2 วิธีการสกัดสมุนไพร	4
2.3 ขั้นตอนการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยา	5
2.4 มาลาเรีย	9
2.5 สมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมาลาเรีย	10
2.6 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย	10
2.7 สีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.)	20
2.8 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	23
3.2 ขั้นตอนการวิจัย	25
3.3 วิธีการทดลอง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย และการวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการหา solvent system ที่เหมาะสมใสการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี column chromatography 30

4.2 ผลการทดสอบ crude extract ทางเภสัชวิทยา 32

4.3 ผลการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี column chromatography 33

4.4 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัล และโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค FT-IR และNMR 36

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 52

5.2 ข้อเสนอแนะ 54

เอกสารอ้างอิง 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่าง ๆ 30

ตารางที่ 4.2 ผลของการเรืองแสงต่อ UV spectrophotometer 30

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียของใบสีฟันคนทา 32

ตารางที่ 4.4 รายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography 33

ตารางที่ 4.5 ผลสรุปการแยก crude extract ชั้น methanol ด้วย column chromatography 33

ตารางที่ 4.6 รายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น chloroform ด้วย column chromatography 34

ตารางที่ 4.7 ผลสรุปการแยก crude extract ชั้น chloroform ด้วย column chromatography 34

ตารางที่ 4.8 รายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography 35

ตารางที่ 4.9 ผลสรุปการแยก crude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography 35

ตารางที่ 4.10 แสดงรหัสของสารที่แยกออกจาก crude extract ในตัวทำละลายต่างๆ 36

ตารางที่ 4.11 ผลตรวจสอบด้วย TLC และdeveloping solvent ของสาร HP(L)/1/MeOH 36

ตารางที่ 4.12 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก FT-IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ ของสารHP(L)/1/MeOH 37

ตารางที่ 4.13 ค่า ^{1}H chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ของสารHP(L)/1/MeOH 37

ตารางที่ 4.14 ค่า ^{13}C chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ของสารHP(L)/1/MeOH 38

ตารางที่ 4.15 ผลตรวจสอบด้วย TLC และdeveloping solvent ของสาร HP(L)/1/$CHCl_3$ 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก FT-IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ ของสารHP(L)/1/$CHCl_3$ 42

ตารางที่ 4.17 ค่า ^1H chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ของสารHP(L)/1/$CHCl_3$ 43

ตารางที่ 4.18 ค่า ^{13}C chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ของสารHP(L)/1/$CHCl_3$ 43

ตารางที่ 4.19 ผลตรวจสอบด้วย TLC และdeveloping solvent ของสาร HP(L)/1/hex 47

ตารางที่ 4.20 ค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก FT-IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ ของสารHP(L)/1/hex 47

ตารางที่ 4.21 ค่า ^1H chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ของสารHP(L)/1/hex 48

ตารางที่ 4.22 ค่า ^{13}C chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ของสารHP(L)/1/hex 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
รูป 2.1 รูปของ Vacuum rotary evaporator	7
รูป 2.2 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารแอลคาลอยด์สำคัญจากเปลือกชิงโคนา	12
รูป 2.3 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากย่อมคำ	12
รูป 2.4 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากกอมขม	13
รูป 2.5 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากรากย่านาง	14
รูป 2.6 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากชิงเฮา	15
รูป 2.7 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ simalikalactone D	15
รูป 2.8 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากรากปลาไหลเผือก	16
รูป 2.9 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากผลราชดัด	17
รูป 2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากใบสะเดา	18
รูป 2.11 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากสะเดาอินเดีย	18
รูป 2.12 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากกระทงลาย	19
รูป 2.13 แสดงรูปของต้นคนทา (Harrisonia Perforata Merr.)	20
รูป 2.14 แสดงโครงสร้างของ Peucenin 7 – methyl ether (1) , O – methylalloptaeroxylin (2) และ perforatic acid (3)	22
รูป 4.1 รูปแสดงผลการแยกของ crude extract ในชั้นต่าง ๆ ด้วย TLC โดยผ่านการย้อมสีด้วย developing solvent	31
รูป 4.2 FT-IR spectrum ของ HP(L)/1/MeOH	39
รูป 4.3 ^{1}H NMR spectrum ของ HP(L)/1/MeOH	40
รูป 4.4 ^{13}C NMR spectrum ของ HP(L)/1/MeOH	41
รูป 4.5 FT-IR spectrum ของ HP(L)/1/$CHCl_3$	44
รูป 4.6 ^{1}H NMR spectrum ของ HP(L)/1/$CHCl_3$	45
รูป 4.7 ^{13}C NMR spectrum ของ HP(L)/1/$CHCl_3$	46
รูป 4.8 FT-IR spectrum ของ HP(L)/1/hex	49
รูป 4.10 ^{1}H NMR spectrum ของ HP(L)/1/hex	50
รูป 4.11 ^{13}C NMR spectrum ของ HP(L)/1/hex	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

L	Leaf
TLC	Thin-Layer Chromatography
FT-IR	Fouries Transform Infrared Spectrometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer
UV	Ultra violet
Hex	Hexane
MeOH	Methanol
$CHCl_3$	Chloroform
HP	Harrisonia perforata Merr
TMS	Tetramethylsilane
DMSO	Dimethyl sulfoxide
CD_3OD	Tetradeutero methanol
$CDCl_3$	Deutero chloroform

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยมีสมุนไพร (natural products) อยู่เป็นจำนวนมากมายหลายชนิด และได้รู้จักนำเอาพืชมาใช้เป็นยาตั้งแต่สมัยโบราณ เดิมนำมาใช้ในรูปของพืชสด พืชแห้ง ต่อมาจึงมีการพัฒนาเตรียมแบบง่าย ๆ (galenical preparation) ชนิดต่าง ๆ ขึ้น และได้มีการวิวัฒนาการ เพื่อให้ได้ยาที่มีรูปแบบน่าใช้ และให้ผลการรักษาแน่นอน จึงได้มีการสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มาใช้เป็นยาในรูปสารบริสุทธิ์ และได้เพิ่มประสิทธิภาพในตัวยารักษาโรค[1]

ต้นคนทา หรือ สีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.) เป็นสมุนไพรไทยประเภทหนึ่งที่มีผู้ศึกษาในส่วนที่เป็นตัวเปลือก ลำต้น รากไม้ เพื่อมุ่งเน้นถึงส่วนประกอบอื่นของต้นคนทา คือ ส่วนที่เป็นใบ และกิ่งไม้ การสกัด และการแยกสารสำคัญจะนำเทคนิคพื้นฐานทางด้าน เคมีอินทรีย์มาประยุกต์ใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่าง และการสกัดจากต้นคนทา
2. ศึกษาวิธีการแยกสารประกอบจากต้นคนทา
3. ศึกษาการหาโครงสร้างของส่วนประกอบทางเคมีของต้นคนทา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติที่มีผลในการรักษาโรค โดยสมุนไพรที่ทำการศึกษา คือ ใบ และกิ่งไม้ของต้นคนทา โดยข้อมูลที่ได้จะนำไปศึกษาและเปรียบเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคนั้นทางเภสัชวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ว่าสารที่แยกได้จากใบคนทามีผลในการใช้เป็นตัวยารักษาโรค ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ ถ้าผลการตรวจสอบทางเภสัชวินิจฉัยได้เช่นเดียวกับสารที่สกัดได้จากสมุนไพรประเภทอื่นที่พิสูจน์แล้วว่าใช้รักษาโรคได้ จะนำไปสู่การศึกษารายละเอียดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดหวังว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการเตรียม และการเก็บรักษา สมุนไพรธรรมชาติที่จะใช้ในการวิจัย
2. ทราบถึงวิธีการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร
3. ทราบถึงวิธีการหาระบบของสารละลายที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการตรวจสอบสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรธรรมชาติ
4. ทราบถึงวิธีการแยกสารสำคัญ และการเก็บรักษาเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญ
5. ทราบถึงวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญในสมุนไพรธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สมุนไพร

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

ยาสมุนไพร ได้ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคนานมาแล้ว โดยอาจจะใช้ในรูปของยาต้ม (decoction), ยาชง (infusion), ทิงเจอร์ (tincture) แต่เพื่อความสะดวกในการใช้ยาสมุนไพรปัจจุบันมีการสกัดสารสำคัญ (active constituents) จากยาสมุนไพรเพื่อนำมาใช้เป็นยารักษาโรคหรือเป็นส่วนประกอบในตำรับยา ตัวอย่างเช่น การสกัดมอร์ฟีนจากฝิ่นเพื่อนำมาใช้เป็นยาแก้ปวด และการสกัดวินบลาสทีน (vinblastine) และวินคริสทีน (vincristine) จากแพงพวยฝรั่ง เพื่อนำมาใช้รักษามะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้สารสำคัญบางชนิดที่สกัดได้จากสมุนไพรยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมน และยาจำพวกสเตียรอยด์ (steroids) เช่น ซาโปนิน (saponins) ที่สกัดได้จากหัวกลอยใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เป็นต้น จากการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์ การสกัด และแยกสารเคมีบริสุทธิ์ที่ได้จากพืชทำให้นักวิทยาศาสตร์ เชื่อว่าสารเคมีเหล่านี้เองที่เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของสมุนไพรนั้น ๆ สารเคมีที่แยกได้จากพืช ที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ อาจจำแนกเป็น 9 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. คาร์โบไฮเดรท (carbohydrate)

คือ สารที่ประกอบด้วย C, H และ O ในปัจจุบันกลุ่มของคาร์โบไฮเดรทที่ใช้ในทางยา มักใช้อยู่ในรูปของ glucose, starch, agar, pectin เป็นต้น

2. แอลคาลอยด์ (alkaloid)

เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ คุณสมบัติส่วนใหญ่มีรสขมไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีฤทธิ์เป็นด่าง และมักมีฤทธิ์ต่าง ๆต่อร่างกายพบมากในส่วนต่างๆของพืช เช่น ในเมล็ดของหมาก ในผลของพริกไทย ในเปลือกของซิงโคนา และในรากของระย่อม เป็นต้น

3. ไกลโคไซด์ (glycoside)

เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น aglycone (genin) กับส่วนที่เป็นน้ำตาลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาศาสตร์ของสารประกอบกลุ่มนี้จะกว้างขวางมากแตกต่างกันออกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. น้ำมันระเหย (volatile oil or essential oil)

เป็นน้ำมันที่ได้จากพืชโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ หรือการบีบมีกลิ่นรสเฉพาะ ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ ประโยชน์ทางด้านยานอกจากใช้เป็นตัวแต่งกลิ่น จะใช้ในทางขับลม ฆ่าเชื้อ และทาถูนวด

5. ไขมัน (lipid)

คือ สารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ประโยชน์ใช้เตรียมขี้ผึ้ง หรือใช้เป็นยาระบาย รักษาโรคผิวหนัง

6. เรซิน (resin)

คือ สารอินทรีย์ หรือสารผสมประเภทพอลิเมอร์ มีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

7. วิตามิน (vitamin)

หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่เล็กน้อยในอาหาร

8. ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

เป็นผลิตผลทางเคมีที่ได้จากสิ่งมีชีวิต

9. สเตอรอยด์ (steroid)

คือ สารอินทรีย์ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากพืช และสัตว์

2.2 วิธีการสกัดสมุนไพร

การสกัดจากสมุนไพร มี 5 วิธีคือ

1. **infusion** เป็นวิธีการนำเอาสมุนไพรที่บดหยาบๆ มาสกัดเอาตัวยาที่สามารถละลายน้ำออกมาโดยการแช่สมุนไพรนั้นในน้ำเย็น หรือน้ำร้อนชั่วระยะเวลาหนึ่ง ยาชงที่ได้เก็บได้ไม่นาน จึงต้องเตรียมใหม่ๆ ทันที

2. **decoction** เป็นวิธีการต้มสมุนไพรกับน้ำเพื่อสกัดเอาตัวยาที่ละลายน้ำออกมา โดยการเติมน้ำเย็นลงผสมกับสมุนไพรในภาชนะที่เหมาะสม แล้วต้มเป็นเวลานานประมาณ 15 นาที ทิ้งให้เย็น บีบกากเพื่อเอาน้ำที่ยังค้างอยู่ในกากออกมาด้วย อาจจะต้องกรองเมื่อจำเป็น แล้วจึงเติมน้ำเพื่อให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ การสกัดโดยวิธีนี้ทำได้เฉพาะสมุนไพรที่มีตัวยาที่ละลายน้ำ และทนต่อความร้อน การสกัดวิธีนี้มักได้ น้ำตาล โปรตีน ปนมากับตัวยาด้วย

3. **digestion** ต่างจากยาชงและยาต้มที่ใช้เวลานานกว่า และใช้อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส

4. **macreation** คือ การหมักสมุนไพรที่บด ได้ขนาดตามที่ต้องการในตัวทำละลายที่เหมาะสม อาจใช้เวลา 3-7 วัน หรือตามความเหมาะสม และ ต้องเขย่าเป็นครั้งคราว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. **percoration** คือ การสกัดโดยวิธีให้ตัวทำละลายค่อย ๆ ไหลผ่าน column พิเศษ ที่บรรจุสมุนไพรสำหรับสกัดโดยวิธีนี้โดยเฉพาะ เมื่อได้สารสกัดตามวิธีข้างต้น ก็สามารถที่จะนำสารสกัดซึ่งอาจมีตัวยาหลายชนิดปนกันอยู่ดำเนินการต่อได้ 3 วิธีด้วยกัน คือ

5.1 **การสกัดบริสุทธิ์** โดยนำวิธีการแยกสารด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เพื่อแยกให้ได้ตัวยาที่ต้องการในรูปของสารบริสุทธิ์

5.2 **การสกัดกึ่งสังเคราะห์** โดยนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้ไปดัดแปลง โครงสร้างทางเคมี เพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีคุณสมบัติในการรักษาที่ดีขึ้น หรือมีพิษน้อยลง

5.3 **การสกัดอย่างหยาบ** โดยนำสารสกัดที่ได้มาเตรียมยาในรูปยาเตรียมอย่างง่าย ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้เลย หรือนำไปผสมกับยาเตรียมอื่น[2]

2.3 ขั้นตอนการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยา

ในการนำสารบริสุทธิ์มาใช้เป็นยาจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึง สิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่ การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นปน ไม่มีโรคพืช และผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืช การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยวิธีการทำสมุนไพรให้แห้งโดยคงคุณภาพของสมุนไพร ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็ว และใช้อุณหภูมิต่ำๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปได้

2. การสกัดสารสำคัญจากพืช (Extraction)

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดี และข้อจำกัดแตกต่างกัน การสกัดที่ใช้ในการวิจัย คือ Macreation เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถเป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่า หรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือกใช้ตัวทำละลาย

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ

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

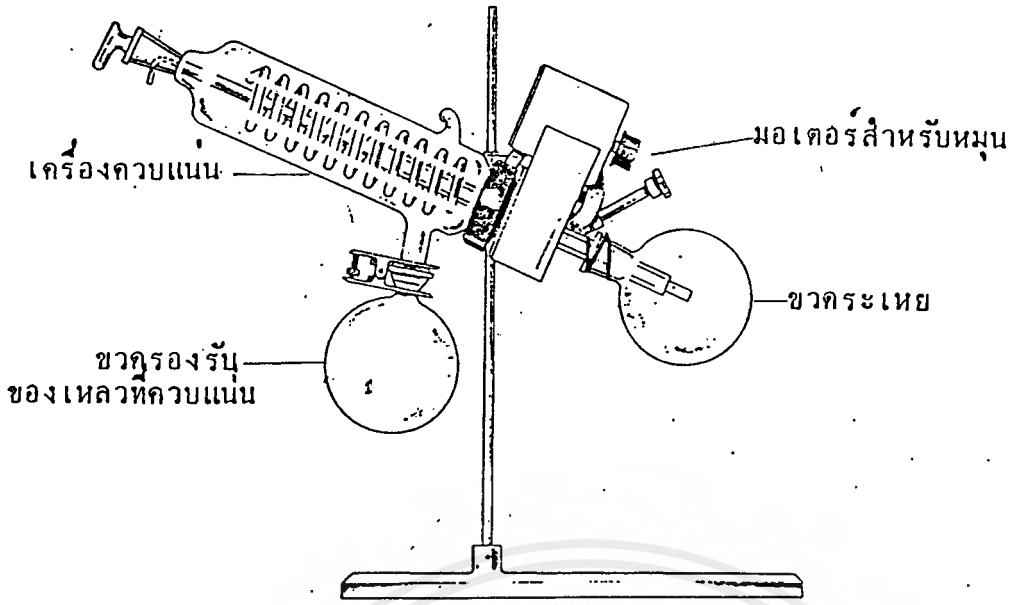
ในการเลือกใช้ตัวทำละลายเราอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน
2. ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (selectivity)

3. การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรมาก และเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อน วิธีที่ใช้ในการวิจัย คือ ทำการระเหยโดยใช้ Vacuum rotary evapolator ทำโดยการใส่สารละลายที่ต้องการระเหยลงในขวดระเหย (evaporation flask) ที่หมุนได้ด้วยมอเตอร์ การหมุนขวดระเหยจะทำให้สารละลายกระจายออกเป็นฟิลม์บาง ๆ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการระเหย ไอของตัวทำละลายที่เกิดขึ้นในขวดระเหย จะผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งไอจะควบแน่นเป็นของเหลวไหลลงสู่ขวดรองรับ ขณะทำการระเหยอาจให้ความร้อนแก่สารละลายโดยจุ่มขวดระเหยในเครื่องอัง และวิธีนี้เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันให้เกือบเป็นสูญญากาศ โดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ distillation flask condenser, receiving flask และdistillation flask จะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำ เพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึง และสม่ำเสมอ ดังรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป 2.1 รูปของ Vacuum rotary evaporator

4. <u>การแยกส่วนผสม</u> (Separation)

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมีเพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์ จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้ เทคนิค และอุปกรณ์ต่างๆ

<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
3. ใช้ตรวจสอบ fraction ที่ได้มาจาก column chromatography เพื่อรวม fraction ที่เหมือนกัน
4. แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย
5. ใช้แยกสารปริมาณมาก ซึ่งแยกโดยวิธี column chromatography ไม่ได้ผล
6. ใช้หาปริมาณสารในสารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Column chromatography

เป็นวิธีการแยกสาร โดยให้สารเคลื่อนที่ไปบน stationary phase ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วกลวง

- **Column** เป็นหลอดแก้วกลวง โดยมากจะต้องมีอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวของหลอดแก้วกลวง = 1:10 การจะใช้ column ยาวเท่าไรขึ้นอยู่กับความยากง่ายในการแยก ถ้า column ยาวจะยิ่งดีขึ้นเหมาะสำหรับแยกสารเป็นจำนวนมาก

- **Adsorbent** ชนิดของ adsorbent ที่ใช้ก็เช่นเดียวกับ adsorbent ของ TLC อัตราส่วนของ adsorbentที่ใช้ และปริมาณสารที่จะแยกขึ้นกับกระบวนการแยก

5. การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

ใช้เทคนิคทาง spectroscopy เช่น Fourier Transform Infrared, Nuclear Magnetic Resonance เป็นต้น ในการวิเคราะห์สารที่แยกออกมาได้จากส่วนผสม[1]

หลักการของ FT-IR

ฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม (Fourier Transform Spectroscopy) ได้ช่วยให้การพัฒนาอินฟราเรดส-เปคโตรมิเตอร์มีความได้เปรียบกว่าการวัดด้วยอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์แบบธรรมดา (Dispersive IR) หลายอย่าง เนื่องจากการใช้กลไกต่าง ๆ เช่น ไมเคิลสันอินเตอร์เฟอโรมิเตอร์ (Michelson Interferometer) เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม และเครื่องคอมพิวเตอร์ เป็นต้น

เครื่อง FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) ได้นำเอาหลักการของไมเคิลสันอินเตอร์เฟอโรมิเตอร์ (Michelson Interferometer) มาใช้แทนอุปกรณ์กระจายแสง (slit) แล้วทำการวัดความเข้มของแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ กันอย่างต่อเนื่องเทียบกับเวลา เรียกว่า Time-Domain Spectroscopy หรือโดยทั่วไปเรียกว่า Fourier Transform Spectroscopy จากนั้น time-domain spectrum (หรือ Interferogram) จะถูกเปลี่ยนเป็น frequency-domain spectrum ด้วย fourier transform จากการใช้คอมพิวเตอร์ ซึ่งสิ่งที่แตกต่างกันระหว่าง frequency-domain spectrum ของ dispersive IR กับ FT-IR คือ spectrum ที่ได้จาก dispersive IR เป็น spectrum ที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความถี่ต่าง ๆ กัน ทีละครั้งในช่วงระยะเวลาอันหนึ่ง แต่ spectrum จาก FT-IR ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความถี่ต่างๆ พร้อมกันทั้งหมด ดังนั้น fourier transform จึงช่วยทำให้การวิเคราะห์รวดเร็วขึ้น การแยก (resolution) ก็ดีขึ้น และทำให้ signal-to-noise ratio ดีขึ้นกว่าธรรมดา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของ FT-IR

1. ใช้หาข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของสาร โดยพิจารณาช่วงความถี่ของแถบดูดกลืนรังสีของพันธะชนิดต่างๆ ใน FT-IR spectrum

2. ใช้สำหรับเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์โครงสร้างของสาร โดยใช้ FT-IR spectrum ของสารประกอบสองตัว ที่วัดในตัวกลางเดียวกัน สามารถจะนำมาเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารเดียวกัน

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer)

ปรากฏการณ์ NMR

นิวเคลียสทุกชนิดมีคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่เรียกกันว่า เลขสปิน (spin number หรือ spin quantum number) ซึ่งเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ I ค่า I นี้อาจจะเป็น 0, ½, 1, 3/2,.....ขึ้นอยู่กับว่านิวเคลียสนั้นมีเลขมวล (mass number) และเลขอะตอม (atomic number) เท่าใด ดังปรากฏตามความสัมพันธ์ต่อไปนี้

	เลขมวล	เลขอะตอม	เลขสปิน
ประเภทที่ 1	คี่	คู่คี่หรือ	½, 3/2, 5/2,...
ประเภทที่ 2	คู่	คู่	0
ประเภทที่ 3	คู่	คี่	1, 2, 3,.....

นิวเคลียสที่มีเลขสปินมากกว่า 0 ดังประเภทที่ 1 และ 3 มีสมบัติเสมือนหนึ่งว่าหมุนรอบตัวเองได้ เนื่องจากภายในนิวเคลียสเหล่านี้มีประจุอยู่ และเราทราบจากความรู้ทางฟิสิกส์ว่าประจุที่หมุนรอบตัวเองจะทำให้เกิดสนามแม่เหล็กขึ้น ดังนั้นนิวเคลียสเหล่านี้จึงมีสมบัติเสมือนเป็นแท่งแม่เหล็กเล็กๆ ที่มีแกนอยู่ในทิศเดียวกันกับแนวของสปินของนิวเคลียส และย่อมมีแมกเนติคโมเมนต์ ซึ่งเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ μ ต่างกัน

เมื่อไม่มีแรงสนามแม่เหล็กภายนอกกระทำกับนิวเคลียสเลย สปินของนิวเคลียสเหล่านี้จะวางตัวได้อย่างอิสระไม่มีการวางตัวเป็นพิเศษในทิศใดทิศหนึ่งแต่อย่างใด แต่เมื่ออยู่ในระหว่างขั้วแม่เหล็ก สปินของนิวเคลียสเหล่านี้จะมีลักษณะการวางตัวเฉพาะ โดยมีทิศทางที่สามารถจะวางตัวได้เท่ากับ $2I + 1$ และแต่ละทิศทางของการวางตัวก็จะมีระดับพลังงานที่ quantized (quantized กล่าวคือ อนุภาคใดก็ตามจะมีพลังงานได้ก็เฉพาะในระดับพลังงานบางระดับเท่านั้น การเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับพลังงานจะต้องมีการดูดกลืนพลังงานหรือคายพลังงานเป็นปริมาณเท่ากับผลต่างของระดับพลังงานทั้งสองพอดี)

Chemical shifts ของโปรตอนชนิดต่างๆ

โปรตอนแต่ละชนิดไม่เพียงจะมีค่า chemical shift ต่างกัน จะยังมีค่า chemical shift เฉพาะตัวซึ่งใช้บอกลักษณะเฉพาะของโปรตอนแต่ละชนิดได้

Integrals

ใน NMR สเปคตรัมนั้นที่ให้สัญญาณแต่ละแผ่นจะแปรผันเป็นสัดส่วนกับจำนวนโปรตอนที่ก่อให้เกิดสัญญาณนั้นโดยความสูงของเส้น integral บอกอัตราส่วนของโปรตอนแต่ละชนิดในโมเลกุลนั้น[3]

2.4 มาลาเรีย (malarial)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันการเจ็บไข้ได้ป่วยสามารถเกิดได้กับมนุษย์ทุกคน ทำให้มีการคิดค้นหาตัวยาต่าง ๆ มาป้องกัน และรักษาอาการเจ็บป่วยให้หมดไป แต่โรค "มาลาเรีย"ซึ่งได้มีตัวยาที่ใช้ป้องกัน และรักษา แต่ผลที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้น่าคิดว่าควรจะมีการศึกษาค้นคว้าหาตัวยาใหม่ ๆ ซึ่งจากข้อมูลที่ได้มาจากคนพื้นเมืองในจังหวัดเลย ทราบว่ามีสมุนไพรตัวหนึ่งที่สามารถใช้รักษาโรคมาลาเรียได้ คือ ต้นคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.)

มาลาเรียเป็นโรคที่มีชุกชุมในประเทศที่อยู่ในเขตร้อนทั่วๆไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาใต้ โรคมาลาเรียเกิดจากเชื้อโปรโตซัวจำพวกพลาสโมเดียม (plasmodium) ซึ่งเป็นพาราสิตอยู่ในเม็ดเลือดแดงของคน และสัตว์เลือดอุ่นบางชนิด เชื้อที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 4 ชนิดคือ P. falciparum ; P. vivax ; P. malariace และ P. ovale โรคนี้ติดต่อกันโดยมียุงก้นปล่อง (Anopheles spp.) เป็นพาหะนำโรค ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีอุบัติการของโรคมาลาเรียชุกชุม โดยเฉพาะในจังหวัดชายแดนที่ติดต่อกับพม่าและกัมพูชา ซึ่งจากสถิติของกองสาธารณสุขของไทยโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยอยู่

การควบคุมโรคมาลาเรียโดยการกำจัดพาหะของโรค คือ ยุงก้นปล่อง ทำให้โรคนี้หมดไปจากหลายประเทศ อย่างไรก็ตามการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงก้นปล่อง ทำให้การกำจัด ป้องกันและรักษาโรคนี้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าตัวยาใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษา โรคมาลาเรีย ทั้งจากการสังเคราะห์และสารธรรมชาติที่แยกได้จากสมุนไพรต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมาลาเรีย (Antimalarial Plants)

สมุนไพรมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคมาลาเรียแต่ดึกดำบรรพ์ มีสมุนไพรเป็นจำนวนมากที่มีการใช้เป็นยารักษามาลาเรียในยาพื้นบ้านของประเทศต่างๆที่มีโรคชุกชุม จากการสำรวจข้อมูลพบว่ามีพืชถึง 152 สกุลที่มีประวัติการใช้รักษามาลาเรีย

สำหรับประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรที่มีรสขมเป็นยาแก้ไข้ รวมทั้งไข้จับสั่น สมุนไพรเหล่านี้ ได้แก่ ราก และเถากระทุงลาย รากเท้ายายม่อม รากประทัดใหญ่ พญามือเหล็ก รากปลาไหลเผือก ก้านสะเดาบ้าน เปลือกสะเดาอินเดีย กอมขม ลูกใต้ใบ พญายา กรุงเขมา บอระเพ็ด ชิงช้าชาลี เป็นต้น จะเห็นได้ว่ามีสมุนไพรหลายชนิดที่มีการใช้ตรงกันในหลายประเทศ ดังนั้น การศึกษาสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ในยาแผนโบราณในท้องถิ่นต่างๆ เหล่านี้ อาจนำไปสู่การค้นพบตัวยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพ หรืออาจพบสารที่สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการคิดค้นสังเคราะห์ตัวยาใหม่ๆได้

2.6 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Natural Antimalarial Agents)

การศึกษาสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ในยาแผนโบราณในท้องถิ่นต่าง ๆ ประกอบกับมีการค้นพบวิธีการเพาะเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมในจากทดลอง ได้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การศึกษาสารต้านมาลาเรียมีความรุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียแล้วเป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สารจำพวกแอลคาลอยด์ และเทอร์ปีน

1. สารจำพวกแอลคาลอยด์

แอลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย มีโครงสร้างหลายแบบด้วยกันดังนี้

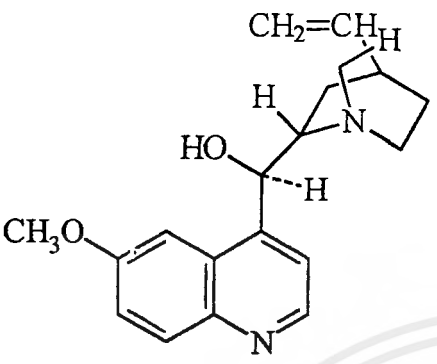
1.1 ควินีน

ควินีนเป็นยารักษามาลาเรียชนิดแรกที่มนุษย์ค้นพบ เป็นสารจำพวกควิโนลีนแอลคาลอยด์ แยกได้จากเปลือกซิงโคนา (Cinchona Bark หรือ Jesuit's Bark) โดยจะมีแอลคาลอยด์ประมาณ 8-12 % ซึ่งจะเป็นควินีนเสียกึ่งหนึ่งถึง 3 ใน 4 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเปลือกซิงโคนา นอกจากนี้ยังมีควินิดีน และแอลคาลอยด์ย่อยอื่นๆ

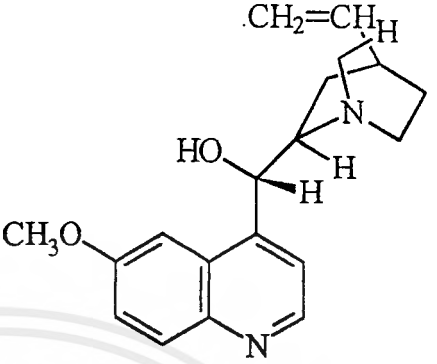
ควินีน และอนุพันธ์ (4-amino quinoline) สามารถฆ่าเชื้อพลาโมเดียมในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง แต่ไม่มีผลต่อระยะอื่นๆ จึงไม่สามารถใช้ป้องกันโรคได้ อย่างไรก็ตามประโยชน์ที่สำคัญของควินีนในปัจจุบันก็คือ ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนควินิดีน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้เช่นกัน แต่มีฤทธิ์ในการกดหัวใจด้วยปัจจุบันใช้เป็นยาป้องกันและรักษา cardiac arythmia



Quinine

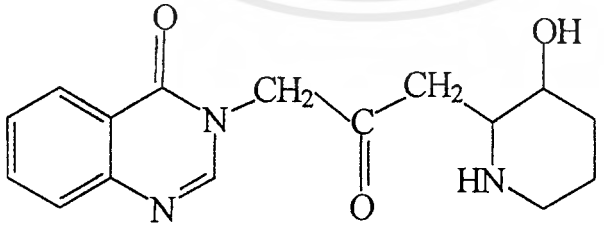


Quinidine

รูปที่ 2.2 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารแอลคาลอยด์สำคัญจากเปลือกชิงโคนา

1.2 Febrifugine

Febrifugine เป็นแอลคาลอยด์สำคัญในสมุนไพรจีน Chang shan ซึ่งจากการศึกษาพบว่าในใบ และรากของฮ่อมดำมีแอลคาลอยด์สำคัญคือ febrifugine (β-dichroine หรือ dichroine B) เมื่อนำไปทดลองในสัตว์ปีกพบว่าสารนี้มีฤทธิ์แรงกว่าควินีนถึง 64 - 100 เท่า นอกจากนี้ยังมีการทดลองในลิง และการทดลองขั้นคลินิคกับผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ และโอวาเล แต่มิได้มีการนำสารนี้มาใช้เป็นยารักษามาลาเรียในคนเนื่องจาก febrifugine มีฤทธิ์ข้างเคียงคือ ทำให้มีอาการอาเจียนอย่างรุนแรง และยังมีความเป็นพิษต่อตับสูงอีกด้วย



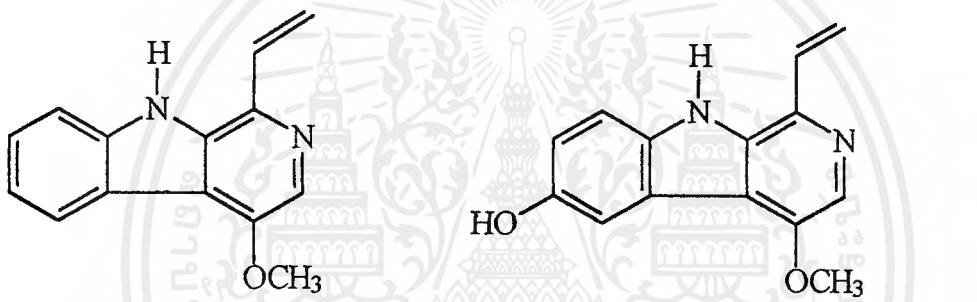
Febrifugine

รูปที่ 2.3 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากฮ่อมดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 Carboline Alkaloids

กอมขม (Picrasma javanica วงศ์ Simaroubaceae) เป็นสมุนไพรไทยที่มีประวัติการใช้แก้ไข้ต่างๆ ตลอดจนไข้จับสั่นในตำรายาไทยโดยใช้ส่วนของเนื้อไม้ จากการศึกษาของ ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา และคณะ (1987) พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในสมุนไพรนี้เป็นแอลคาลอยด์ในกลุ่มอินดอล มีโครงสร้างเป็น β-carboline ได้แก่ 4 – methoxy – 1 – vinyl - β - carboline และ 6 – hydroxy – 4 – methoxy – 1 – vinyl - β - carboline สารทั้ง 2 นี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อฟัลซิปารัมในหลอดทดลอง โดยมีค่า ID_{50} เท่ากับ 2432.3 และ 3280.5 ng/ml ตามลำดับ



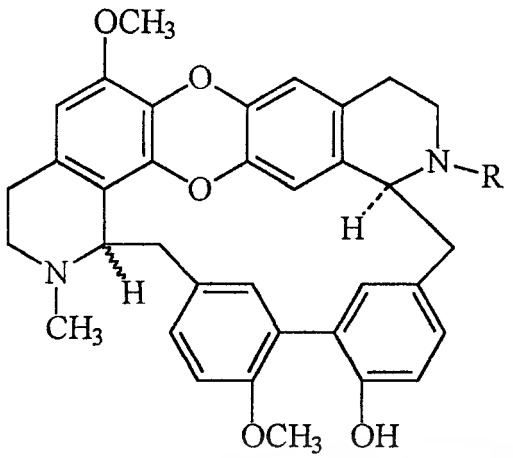
4-methoxy-1-vinyl-β-carboline 6-Hydroxy-4-methoxy-1-vinyl-β-carboline

รูปที่ 2.4 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากกอมขม

1.4 Tiliacorinine

รากย่านาง (Tiliacora triandra Diels วงศ์ Menispermaceae) เป็นสมุนไพรที่ใช้เป็นยาแก้ไข้อยู่ในยาพื้นบ้านของไทย โดย ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา และคณะ (1989) ได้แยกแอลคาลอยด์ ซึ่งไม่ละลายน้ำจากรากย่านางได้หลายชนิด จากการศึกษาสูตรโครงสร้างพบว่า แอลคาลอยด์เหล่านี้เป็นอนุพันธ์ของ bisbenzylisoquinoline ตัวอย่าง เช่น tiliacorinine และ nor-tiliacorinine A ซึ่งมีค่า ID_{50} เท่ากับ 3533 และ 558 ng/ml ตามลำดับ แอลคาลอยด์เหล่านี้สามารถแยกออกจากแอลคาลอยด์ละลายน้ำได้อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์คล้าย curare ได้โดยกรรมวิธีที่ไม่ยุ่งยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



R = CH_3 ; I S : I ' S = Tiliacorinine

R = H ; I S : I ' S = Nor-Tiliacorinine A

รูปที่ 2.5 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากรากย่านาง

2. สารจำพวกเทอร์ปีน

สารเทอร์ปีนที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียมีตั้งแต่ sesquiterpene ไปจนถึงไตรเทอร์ปีน

2.1 สารจำพวกเสสควิเทอร์ปีน

สารจำพวกเสสควิเทอร์ปีนแลคโตน เป็นสารที่มีการกระจายตัวกว้างขวางมากในพืชวงศ์ Compositae สารในกลุ่มนี้หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านเซลมะเร็ง แต่สารที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในกลุ่มนี้ ได้แก่ ชิงเฮาซู ยารักษามาลาเรียชนิดล่าสุดจากสมุนไพรจีน

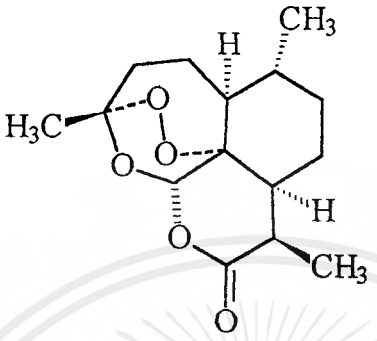
ชิงเฮาซู

ชิงเฮา (Qinghao) ได้จากต้น Artemisia annua L. วงศ์ Compositae ซึ่งมีประวัติในการใช้เป็นยารักษามาลาเรีย ในประเทศจีนมากว่า 2000 ปี โดยในระยะแรกมีการทดสอบสารสกัดน้ำและแอลกอฮอล์จากชิงเฮา โดยใช้ความร้อนไม่ให้ผลเมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อ Plasmodium berghii ในหนู และเชื้อ P. cynomolgi ในลิง ในปี ค.ศ. 1972 จึงสามารถแยกสารสำคัญ คือ ชิงเฮาซู (Qinghaosu, QHS หรือ artemisinin) ได้จากส่วนเหนือดินของสมุนไพรนี้ได้ในปริมาณ 0.01-0.5 % และหาสูตรโครงสร้างของสารนี้ได้ในปี ค.ศ. 1979

Qinghaosu (QHS) หรือ artemisinin เป็นสารสำคัญ ซึ่งเป็น clinically proven plasmocidal agent เป็นสารจำพวก sesquiterpene lactone ซึ่งมี endoperoxide group อยู่ในโมเลกุล นับเป็นสารที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย จากการศึกษาความสัมพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างการออกฤทธิ์ต้านมาลาเรีย และโครงสร้างของสารนี้ พบว่า peroxide group มีความสำคัญต่อฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาลาเรียก็จะหมดไปด้วยส่วนการ reduction ของ lactone carbonyl จะทำให้ฤทธิ์เพิ่มขึ้น โดยมีการศึกษาด้านเภสัชวิทยา และการทดลองขั้นคลินิคกับคนไข้กว่า 2000 คน พบว่า ชิงเฮาซูเป็นยารักษามาลาเรียแบบใหม่ที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ

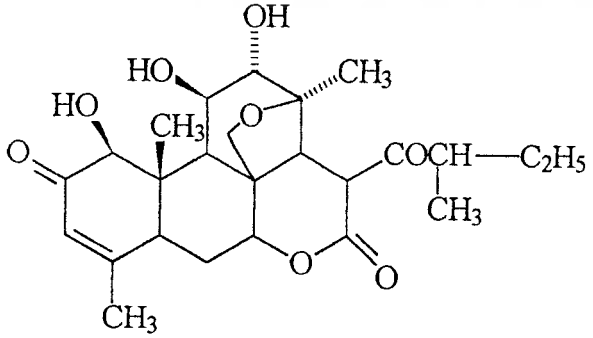


Artemisinin

รูปที่ 2.6 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากชิงเฮา

2.2 สารจำพวก quassinoid

Quassinoids หรือ simarubolides เป็นกลุ่มสารขม ซึ่งพบในพืชวงศ์ Simaroubaceae เป็นอนุพันธุ์ของไตรเทอร์ปีน ประกอบด้วย C-18 ถึง C-29 สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทางชีววิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านอะมีบา ฤทธิ์ต้านไวรัส รวมทั้ง antifeedant activity สารในกลุ่มนี้หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียสูง แต่มักมีความเป็นพิษสูงเช่นกัน จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านมาลาเรียกับสูตรโครงสร้างของสารเหล่านี้ สรุปได้ว่า โครงสร้างที่มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย คือกลุ่มเอสเตอร์ที่ C_6 หรือ C_{15} และ oxygen bridge ระหว่าง C_{20} กับ C_{11} หรือ C_{13} ดังในสูตรโครงสร้างของ simalikalactone D

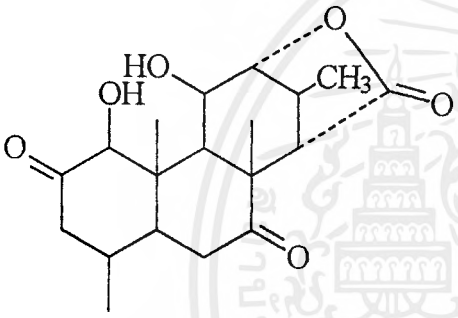


รูปที่ 2.7 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ simalikalactone D

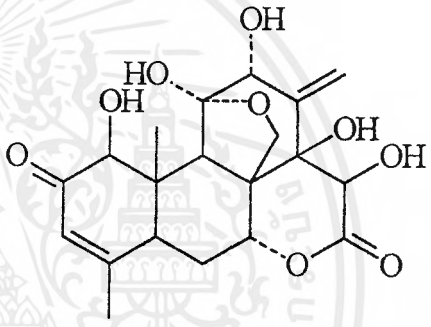
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Eurycomalactone

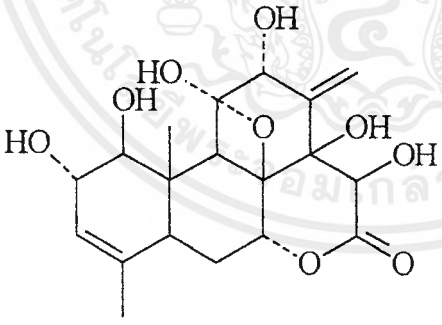
ปลาไหลเผือก (Eurycoma longifolia Jack วงศ์ Simaroubaceae) เป็นสมุนไพรที่มีการใช้เป็นยาแก้ไข้ และไข้จับสั่น ทั้งในประเทศไทยและมาเลเซีย จากการศึกษาส่วนรากของปลาไหลเผือกพบสารจำพวก quassinoid หลายชนิด อาทิ eurycomalacton, eurycomanone และ eurycomanol จากการศึกษาพบว่าสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูง



Eurycomalactone



Eurycomanone



Eurycomanol

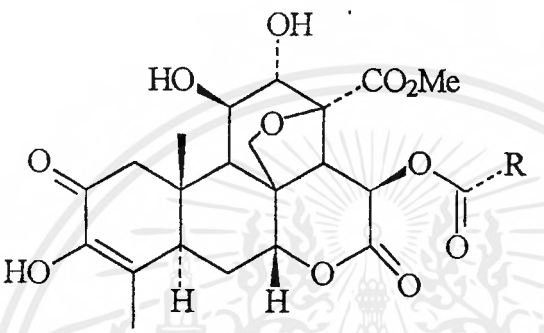
รูปที่ 2.8 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากรากปลาไหลเผือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Bruceines

จากการศึกษาส่วนประกอบเคมีของผลราชดัดพบสารจำพวก quassinoid หลายชนิด รวมทั้ง bruceines A, B และ C ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.66, 8.15 และ 19.5 ng/ml ตามลำดับ Bruceine C ซึ่งมีฤทธิ์แรงที่สุด มีความเป็นพิษสูงด้วย



Bruceine A : $R = CH_2CHMe_2$

Bruceine B : $R = CH_3$

Bruceine C : $R = CH = C(CH_3)\text{-}C(OH)Me_2$

Bruceantin : $R = CH = C(CH_3)\text{-}CHMe_2$

รูปที่ 2.9 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากผลราชดัด

2.3 สารจำพวก limonoids

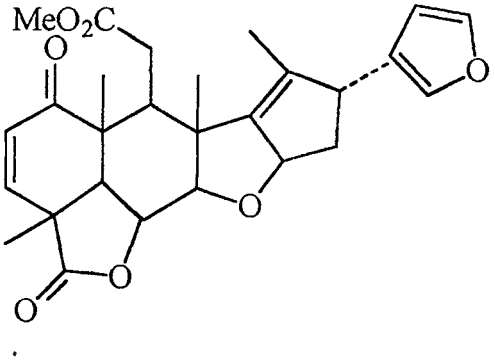
Limonoids มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียต่ำกว่าสารพวก quassinoid ในขณะเดียวกัน สารเหล่านี้ก็มีความเป็นพิษต่ำกว่าด้วย

Nimbolide

ในใบสะเดา พบว่ามีสารออกฤทธิ์เป็นสารจำพวก limonoid ได้แก่ nimbolide สารนี้มีความเป็นพิษต่ำ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 1500 ng/ml สามารถฆ่าเชื้อฟัลซิปารัมสารพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควีนในหลอดทดลองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33496

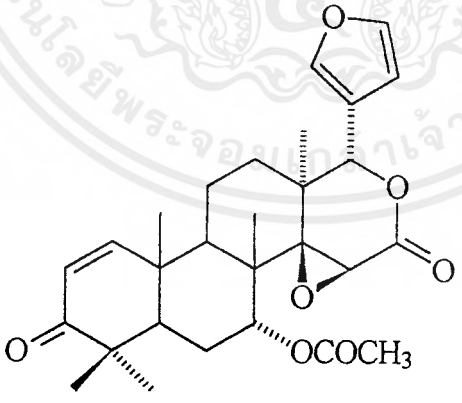


Nimbolide

รูปที่ 2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากใบสะเดา

Gedunin

Gedunin เป็นสารจำพวก limonoid ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งแยกได้จากเปลือกของต้นสะเดาอินเดีย และจากเปลือกเลี่ยน (Melia azedarach L.) วงศ์ Meliaceae Gedunin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 482 ng/ml



Gedunin

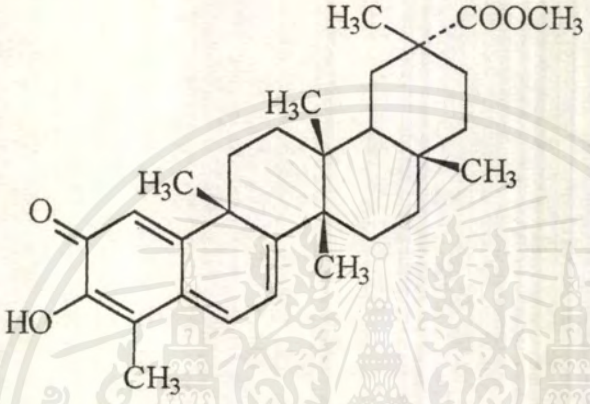
รูปที่ 2.11 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากสะเดาอินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สารจำพวกไตรเทอร์ปีน

Pristimerin

กระทงลาย (Celastrus paniculatus Willd. วงศ์ Celastraceae) จากประวัติการใช้ส่วนรากของกระทงลายพบว่ามีสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียเป็นสารจำพวก Triterpenic acid คือ pristimerin สารนี้มีค่า ID_{50} เท่ากับ 2.80 ng/ml



Pristimerin

รูปที่ 2.12 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียจากกระทงลาย

แม้ว่าปัจจุบันจะมีการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียเป็นจำนวนมากแล้วก็ตาม แต่ส่วนใหญ่จะเป็นเพียงการศึกษาฤทธิ์ของสารต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมในหลอดทดลองเท่านั้น ซึ่งสารเหล่านี้ยังต้องผ่านขั้นตอนของการศึกษาพัฒนาอีกมากมาย กว่าจะนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมาลาเรียในคนได้ สารส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะกลุ่ม quassinoid เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ดังนั้นการนำมาใช้เป็นยาอาจต้องอาศัยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี เพื่อลดความเป็นพิษลง ในจำนวนสารที่มีการค้นพบเหล่านี้ มีเพียงชนิดเดียวที่ผ่านขั้นตอนการทดสอบต่างๆ จนกระทั่งนำมาใช้เป็นยารักษามาลาเรียในคนได้ยานี้ ได้แก่ ชิงเฮาซู ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูง และมีความเป็นพิษต่ำ การใช้ยานี้ยังคงจำกัดอยู่เพียงในประเทศจีน

สำหรับในประเทศไทยได้มีการปลูกทดลอง ปรากฏว่าชิงเฮาซูสามารถขึ้นได้ดี และมีการศึกษาด้านคลินิคของชิงเฮาซูในคนไทยด้วย เป็นที่คาดหวังว่าจะมีการนำยานี้มาใช้ประโยชน์แพร่หลายยิ่งขึ้น[4]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 คนทา (Harrisonia Perforata Merr.)

SIMAROUBACEAE

ชื่ออื่น กะลันทา, สีฟัน, สีฟันคนตาย, สีฟันคนทา, จี้ จี้หนาม, สีเตาะ, หนามจี้

ไม้พุ่มแกมเถา กิ่งก้านมีหนาม ยอดอ่อนมีสีแดง ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ มีครีบที่ก้าน และแกนใบ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปไข่ กว้าง 1-1.5 ซม. ยาว 2-2.5 ซม. ขอบใบหยักดอกช่อออกเป็นกระจุกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง กลีบดอกด้านนอกสีแดงแกมม่วง ด้านในสีนวล ผลเป็นผลสด ค่อนข้างกลมใบ ผลและรากมีรสขม

ตำรายาไทยใช้รากเป็นยาแก้ไข้ทุกชนิด การทดลองในสัตว์พบว่าสารสกัดจากรากและกิ่งมีฤทธิ์ต้านฮีสตามีนซึ่งทำให้เกิดอาการแพ้ นอกจากนี้สารสกัดของใบ และกิ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง[5]

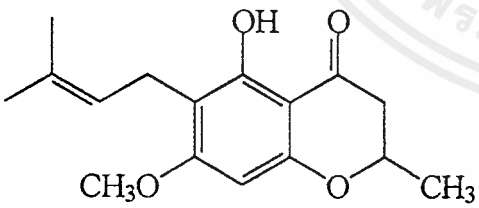
รูปที่ 2.13 แสดงรูปของต้นคนทา (Harrisonia Perforata Merr.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

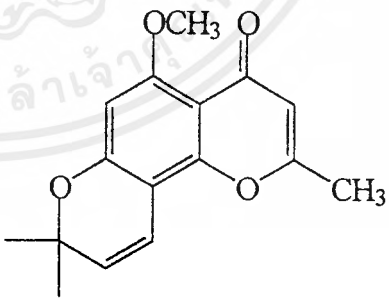
2.8 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey)

S. RUANGSUMRAM และ ผู้ร่วมงาน ได้ค้นพบสารประกอบ 2-hydroxymethyl-3-methylalloptaeroxylin และสารประกอบอีก 8 ชนิด คือ heteropeucenin-7-methylether, perforatic acid, lupeol, คูมารินที่ไม่มีหมู่แทนที่, 5 – hydroxy – 6, 7 – dimethoxycoumarin, ของผสมของแอลกอฮอล์โซ่ตรง (C_{31}-C_{35}), ของผสมสเตียรอยด์ (β-sitosterol, campesterol และ stigmasterol) และ ของผสมของสเตียรอยด์กลัยโคไซด์ (β - sitosteryl – 3 – o - glucopyranoside, chloresteryl –3 – o - glucopyranoside, stigmasteryl – 3 – o - glucopyranoside) สารประกอบทั้งหมดนี้ แยกได้จากรากคนทา (Harrisonia perforata Merr.) โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และเทคนิคทางโครมาโทกราฟี การหาสูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้ ทำโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และหลักฐานทางสเปกโทรสโกปี พบสารที่สกัดได้ในชั้นน้ำ คือ กรดแอมิโน, เกลือคลอไรด์ และน้ำตาล[6]

S.THADANITI และ ผู้ร่วมงาน ได้ค้นพบสาร Peucenin 7 – methyl ether (1), O-methylalloptaeroxylin(2) และperforatic acid (3) จากกิ่งไม้ของต้น Harrisonia perforata(Blanco.) Merr. สกัดได้จากชั้น chloroform โดยใช้เครื่อง Soxhlet ใช้ chromatography ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ การตรวจสอบโครงสร้าง และการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี (3) โดย spectroscopic data[7]

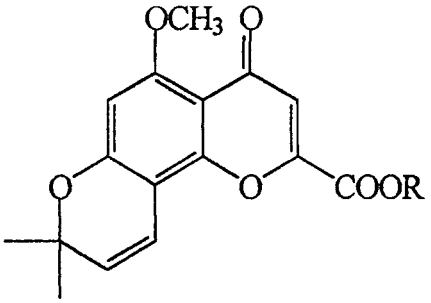


1



2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



3 : R = H

4 : R = CH_3

รูปที่ 2.14 แสดงโครงสร้างของ Peucenin 7-methyl ether(1), O-methylalloptaeroxylin (2) และ perforatic acid(3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

1. นำเปลือกราก และรากของต้นคนทา มาตากลมให้แห้ง และบดจนละเอียด

2. นำเปลือกราก และรากที่บดละเอียดมาสกัด โดยวิธีการแช่ลงในตัวทำละลายhexane และ methanol เป็นเวลา 1สัปดาห์

3. กรองแยกส่วนที่เป็นกาก และชั้นตัวทำละลาย นำชั้นตัวทำละลายมาระเหย โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator เรียกส่วนนี้ว่า crude extract

4. แบ่ง crude extract ที่ได้ส่งทดสอบฤทธิ์ทางยา ดังต่อไปนี้

   4.1 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย

   4.2 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านไวรัส

   4.3 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง

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

6. แยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography

7. วิเคราะห์หาโครงสร้างของสารตรวจสอบ โดยใช้ FT-IR, NMR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียม Crude Extract ในแต่ละชั้นตัวทำละลายต่างๆ

1. นำใบของต้นคนทาแห้งบดละเอียด มาชั่งน้ำหนักและแช่ลงใน hexane เป็นเวลา 1 สัปดาห์ คนอย่างสม่ำเสมอทุกวัน วันละ 15 นาที

2. ค่อยๆ รินกรองเอาสารสกัดออก บีบเอาสารละลายจากกากให้มากที่สุด

3. ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator วิธีนี้จะเป็นการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันลงเกือบเป็นสูญญากาศ

4. ชั่งน้ำหนักของ crude extract (ชั้น hexane) ที่ได้ ให้รหัสเป็น HP(L) / Crude / Hexane

5. นำกากที่ได้จากการกรองในข้อ 2 มาผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ใน chloroform, methanol เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตามลำดับ

6. crude extract ในทุกชั้นของตัวทำละลายส่ง test anti-malarial activity

3.3.2 การระเหยตัวทำละลาย

1. ใส่สารสกัดที่ต้องการระเหยตัวทำละลายลงในขวดก้นกลมประมาณครึ่งขวดก้นกลม

2. นำไปติดตั้งกับเครื่อง Rotary Evaporator โดยตั้งอุณหภูมิที่ 30-40° C

3. เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปแล้ว ในขวดก้นกลมจะเหลือแต่สารสกัดที่เราต้องการ

4. ทำซ้ำข้อ 1- 3 ถ้ายังมีสารสกัดที่ต้องการระเหยเหลืออยู่ โดยใส่ในขวดก้นกลมใบเดิมจนกระทั่งสารสกัดที่ต้องการหมดจึงนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาเปอร์เซนต์ ผลผลิตสารที่ได้ออกมา และเก็บสารที่ได้ไว้วิเคราะห์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 <u>การหา Solvent System ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี Column Chromatography</u>

1. นำ crude extract จากชั้น hexane มาใส่ vial แล้วละลายด้วย hexane

2. เนื่องจากสารที่แยกจากชั้น hexane สารส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีความเป็นขั้วน้อย ดังนั้นตัวทำละลายที่เลือกใช้จึงค่อนข้างจะมีความเป็นขั้วน้อย จึงเลือก hexane กับ ethyl acetate และ dichloromethane เทียบอัตราส่วนเพื่อหา solvent system ที่เหมาะสม

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

4. เตรียม TLC tank ซึ่งมีอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ค่าต่างๆ โดยค่อยๆ เพิ่มขั้ว หลังจากนั้นนำกระดาษกรองวางข้างใน tank และปิดด้วยกระจก

5. จุ่มแผ่น TLC ลงใน TLC tank ตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับ solvent front ที่กำหนดไว้

6. ดูผลการทดลองที่เกิดขึ้นว่าสารแยกเป็นอย่างไร ถ้าสารสามารถแยกเห็นเป็นจุดๆ อย่างชัดเจน แสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็น solvent system ที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่พบจะทำการเพิ่มหรือลดปริมาณนั้นๆ จนกว่าจะได้ระบบที่เหมาะสม

7. นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

8. นำไปย้อมด้วย developing solvent โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจก นำสำลีชุบ developing solvent ป้ายให้ทั่วแผ่นนำไปอุ่นบน hot plate อุณหภูมิประมาณ 50°C จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของจุดของสารที่สนใจ

9. ใช้ solvent system ที่หาได้นำไปใช้ในการแยกสารโดยวิธี Column Chromatography

10. ทำการทดลองซ้ำกับ crude extract ในชั้น chloroform และ methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 <u>การแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ โดยวิธี Column Chromatography</u>

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 (ขึ้นอยู่กับขนาด ปริมาณของสาร) ใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำที่สุดของ solvent system ในแต่ละ crude extract ผสมกับ Silica Gel คนให้เข้ากัน

4. ใช้สำลีอุด column แล้วหยดข้างๆ column ด้วย solvent ที่ใช้ผสมกับ Silica Gel ให้ชุ่มทั่วสำลี

5. เท Silica Gel ที่ผสมแล้วลงใน column ปรับผิวหน้าของ Silica Gel ให้เรียบ โดยเคาะข้าง column เบาๆ

6. ใส่ solvent 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 solvent ของ crude เพียงเล็กน้อย จากนั้นใส่ Silica Gel เบอร์ 7734 คนให้เข้ากัน (ถ้ายังชุ่มด้วย solvent ให้ทำการระเหยตัวทำละลายออกไป) ใส่ crude extract ผสม Silica Gel ลงใน column ให้หมดโดยไม่ต้องทำการกลั้วขวดก้นกลมที่ใช้ด้วย solvent

8. ล้างข้างๆ column ให้สะอาด และให้ solvent ที่อยู่ใน column เหลืออยู่เหนือ crude extract น้อยที่สุด

9. ใช้ solvent ประมาณ 100 ml เป็นตัว eluent ก่อนแล้วค่อยๆ เพิ่มความมีขั้วของสารละลายอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง หลังจากนั้นเก็บสารที่ต้องการแยกใส่หลอดทดลองประมาณครึ่งหลอด จดหมายเลขหลอดที่ใช้ตามลำดับ

10. เมื่อเก็บสารละลายได้ในแต่ละหลอด ทำการตรวจสอบสารที่ออกจาก column ด้วย Thin Layer Chromatography โดยเทียบกับ crude extract ถ้าสารที่ต้องการยังไม่ออกมา อาจจะต้องทำการเพิ่มขั้วของสารละลายอีกโดยเพิ่มทีละ 1% ของ solvent ที่มีขั้วสูงกว่า ตามความเหมาะสม และตรวจสอบทุกหลอดด้วย UV และ developing solvent ตามลำดับ

11. เมื่อทราบว่าสารที่ต้องการแยกออกมาแล้ว (ตรวจสอบจาก TLC) จดบันทึกว่าเริ่มแยกออกมาจากหลอดที่เท่าใด และออกมาหมดเมื่อหลอดที่เท่าใด

12. ผสมหลอดที่มีสารอยู่ลงในขวดก้นกลมโดยใช้ solvent ล้างข้างหลอดทุกหลอดผสมลงไปด้วย และนำไปทำการระเหยตัวทำละลายออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. เมื่อได้สารบริสุทธิ์อยู่ในขวดก้นกลม ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ออกมา และเก็บใส่ตู้เย็นเพื่อนำไปตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้างของสารต่อไป

3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี FT-IR Spectroscopy เพื่อใช้ตรวจหาหมู่ฟังก์ชันนัล และใช้ NMR Spectroscopy เพื่อใช้ตรวจหาโครงสร้างของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย และการวิจารณ์

4.1 ศึกษาการหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี column chromatrography

4.1.1 ผลการหา solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่าง ๆ

เมื่อนำ crude extract จากชั้นต่าง ๆ มาทำการ development ด้วย TLC โดยทำการสุ่มค่า solvent system ต่างๆพบว่า solvent system ที่เหมาะสม แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่างๆ

Crude extract	Solvent system
ชั้น methanol	5% methanol 60% chloroform 35% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
ชั้น chloroform	15% ethyl acetate 85% chloroform 3 หยดของ butanol
ชั้น hexane	45% hexane 50% dichloromethane 5% ethyl acetate

4.1.2 ผลของการเรืองแสงต่อ UV spectrophotometer

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

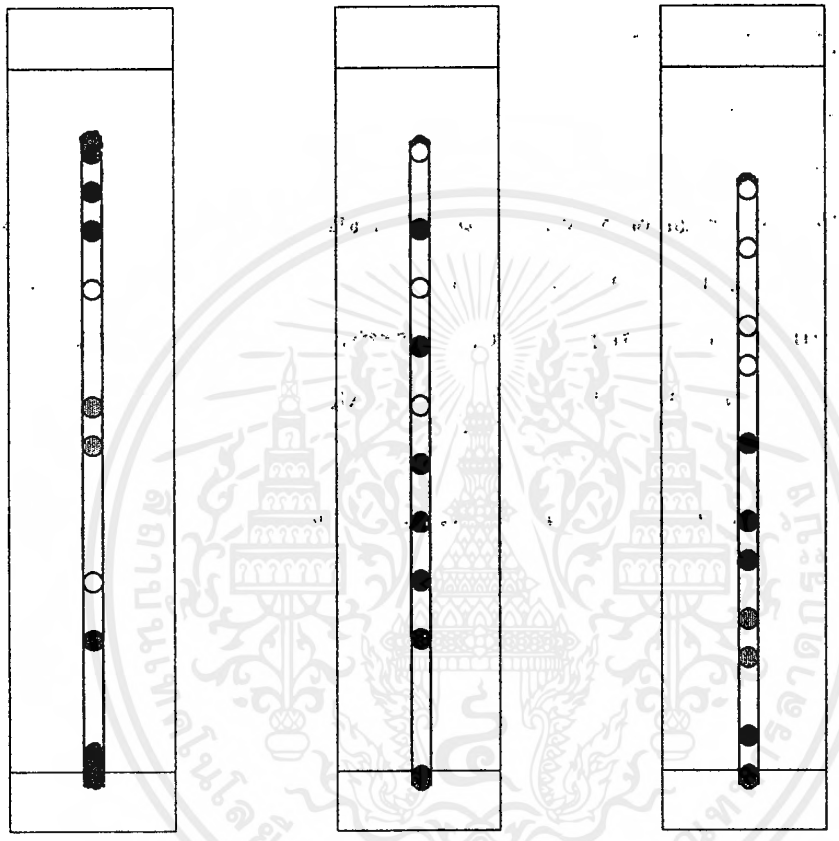
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเรืองแสงต่อแสง UV ของcrude extract ในชั้นต่างๆ

Crude extract	ผลการเรืองแสงต่อแสง UV
ชั้น methanol	พบจุดเรืองแสง 7 จุด
ชั้น chloroform	พบจุดเรืองแสง 6 จุด
ชั้น hexane	พบจุดเรืองแสง 8 จุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการแยก crude extract โดย TLC solvent system ที่เหมาะสม

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



รูปที่ 4.1 รูปแสดงผลการแยกของ crude extract ในชั้นต่าง ๆ ด้วย TLC โดยผ่านการย้อมสีด้วย developing solvent จากรูป หมายเลข 1 คือ crude extract ชั้น methanol หมายเลข 2 crude extract ชั้น chloroform และหมายเลข 3 คือ crude extract ชั้น hexane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบ crude extract ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาและค้นคว้า ได้มีการนำสีฟันคนทามาใช้ในการรักษาโรค ดังนั้น การวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาใบของสีฟันคนทาที่มีผลต่อต้านมาลาเรีย โดยทดสอบ crude extract ที่สกัดได้ในชั้นต่างๆ ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียของใบสีฟันคนทา

Code	Dissolve in	Activity (EC50) (µg/ml)
1. HP(L)/hex	DMSO	4.1
2. HP(L)/$CHCl_3$	DMSO	Inactive
3. HP(L)/MeOH	DMSO	7.4
4. HP(L)/1/hex	DMSO	7.5

จากผลที่ได้ พบว่าใบของสีฟันคนทาที่สกัดได้ในชั้นต่างๆ มีผลต่อต้านเชื้อมาลาเรีย แต่ในชั้นเมทานอล มีผลต่อต้านมาลาเรียมากที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการแยกสารที่อยู่ในใบสีฟันคนทาที่สกัดได้ในชั้นต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ และคาดคะเนโครงสร้างคร่าวๆ ของสารในใบสีฟันคนทา

ในขั้นต้นนี้ทราบว่า crude extract ในชั้นต่างๆ มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย ในขั้นตอนต่อไปจะศึกษาว่า สารประกอบใดใน crude extract ที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย เราจึงมุ่งเน้นที่จะทำการแยกสารใน crude extract โดยวิธี column chromatography เพื่อแยกสารที่ต้องการให้มีความบริสุทธิ์ และนำสารที่แยกได้ในแต่ละชนิดนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ โดยวิธี column chromatography

ผลการทดลองในส่วนนี้กล่าวถึงการแยกสารของ crude extract ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ที่ได้มีการหา solvent system อย่างเหมาะสมมาแล้ว โดยการแยกสารใน crude extract จะต้องอาศัยเทคนิค column chromatography ซึ่งได้ผลดังนี้

4.3.1 crude extract ในชั้น methanol

จากการตรวจสอบด้วย TLC ในชั้นนี้พบสารที่น่าสนใจเพียง 1 ตัวเท่านั้น แล้วทำการแยกโดยอาศัยข้อมูลดังตารางที่ 4.4 และได้ผลสรุปดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ในชั้น methanol ด้วย column chromatography

รายละเอียดที่ใช้ในการแยก	ลักษณะ
silica gel ที่ใช้ pack column	เบอร์ 7729
solvent system ที่เหมาะสม	5% methanol 60% chloroform 35% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
สารใน crude extract ที่ต้องการแยก	1 ตัว

ตารางที่ 4.5 แสดงผลสรุปของการแยก crude extract ในชั้น methanol ด้วย column chromatography

จำนวนสารที่แยกออกมา	1 ตัว
solvent system ที่เหมาะสม	5% methanol 60% chloroform 35% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
solvent system ที่สารเริ่มออกจาก column	100 % chloroform
ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ	7-8
R_f	0.60
ผลจาก TLC	ตาเปล่าไม่พบ, UV. ไม่พบ DS. มีสีชมพู
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็งสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 crude extract ในชั้น chloroform

จากการตรวจสอบด้วย TLC ในชั้นนี้พบสารที่น่าสนใจเพียง 1 ตัวเท่านั้น แล้วทำการแยกโดยอาศัยข้อมูลดังตารางที่ 4.6 และได้ผลสรุปดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ในชั้น chloroform ด้วย column chromatography

รายละเอียดที่ใช้ในการแยก	ลักษณะ
silica gel ที่ใช้ pack column	เบอร์ 7729
solvent system ที่เหมาะสม	85% chloroform 15% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
สารใน crude extract ที่ต้องการแยก	1 ตัว

ตารางที่ 4.7 แสดงผลสรุปของการแยก crude extract ในชั้น chloroform ด้วย column chromatography

จำนวนสารที่แยกออกมา	1 ตัว
solvent system ที่เหมาะสม	85% chloroform 15% ethyl acetate 3 หยดของ butanol
solvent system ที่สารเริ่มออกจาก column	100 % chloroform
ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ	1-8
R_f	0.91
ผลจาก TLC	ตาเปล่าไม่พบ, UV. พบ 1 จุด มีสีม่วง DS. มีสีม่วงเข้ม
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็งสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 crude extract ในชั้น hexane

จากการตรวจสอบด้วย TLC ในชั้นนี้พบสารที่น่าสนใจเพียง 1 ตัวเท่านั้น แล้วทำการแยกโดยอาศัยข้อมูลดังตารางที่ 4.8 และได้ผลสรุปดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ในชั้น hexane ด้วย column chromatography

รายละเอียดที่ใช้ในการแยก	ลักษณะ
silica gel ที่ใช้ pack column	เบอร์ 7729
solvent system ที่เหมาะสม	45% hexane 50% dichloromethane 5% ethyl acetate
สารใน crude extract ที่ต้องการแยก	1 ตัว

ตารางที่ 4.9 แสดงผลสรุปของการแยก crude extract ในชั้น hexane ด้วย column chromatography

จำนวนสารที่แยกออกมา	1 ตัว
solvent system ที่เหมาะสม	45% hexane 50% dichloromethane 5% ethyl acetate
solvent system ที่สารเริ่มออกจาก column	98% hexane 2 % chloroform
ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ	1-2
R_f	0.59
ผลจาก TLC	ตาเปล่าไม่พบ, UV. พบ 1 จุด มีสีม่วง DS. มีสีชมพู
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็งสีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัล และโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค FT-IR, NMR

ในการทำการวิจัยจะระบุรหัสสำหรับแต่ละตัวที่แยกได้จาก crude extract ตามชนิดของสมุนไพร ส่วนของสมุนไพรที่นำมาแยก ตามด้วยจำนวนตัวสารที่แยก และชั้นตัวทำละลาย ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงรหัสของสารที่แยกออกจาก crude extract ในตัวทำละลายต่างๆ

Crude extract	จำนวนสารที่แยกออกจาก column	รหัส
ชั้น methanol	สารตัวที่ 1	HP(L)/1/MeOH
ชั้น chloroform	สารตัวที่ 1	HP(L)/1/$CHCl_3$
ชั้น hexane	สารตัวที่ 1	HP(L) / 1 / hex

4.4.1 HP(L)/1/MeOH

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการตรวจสอบด้วย TLC และdeveloping solvent

ผลจาก TLC	ตาเปล่าไม่พบ, UV. ไม่พบ DS. มีสีชมพู
R_f	0.60
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็งสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR

ตารางที่ 4.12 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก FT-IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ จากรูปที่ 4.2

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3306.27	O-H stretching
2923.81-2851.84	C-H stretching
1626.34-1609.01	C=C Aryl conjugate
1518.25-1467.72	C=C ของวง aromatic
1141.73	C-O stretching

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

ตารางที่ 4.13 แสดงค่า ^1H chemical shift(δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ดังรูปที่ 4.3 เมื่อใช้ CD_3OD เป็น solvent

δ (ppm)	พันธะที่น่าจะมีของสาร
6.9-6.4	Ar-OH
5.6-5.8	-CH=CH-
4.5-4.8	MeOH(solvent)
4.2-4.5	-CH-O-
3.7-3.9	$-CH_2-O-$
3.1-3.2	CH_3-O-
2.3-2.8	CH_3-Ar
0.6-1.5	$-CH_3$, $-CH_2-$

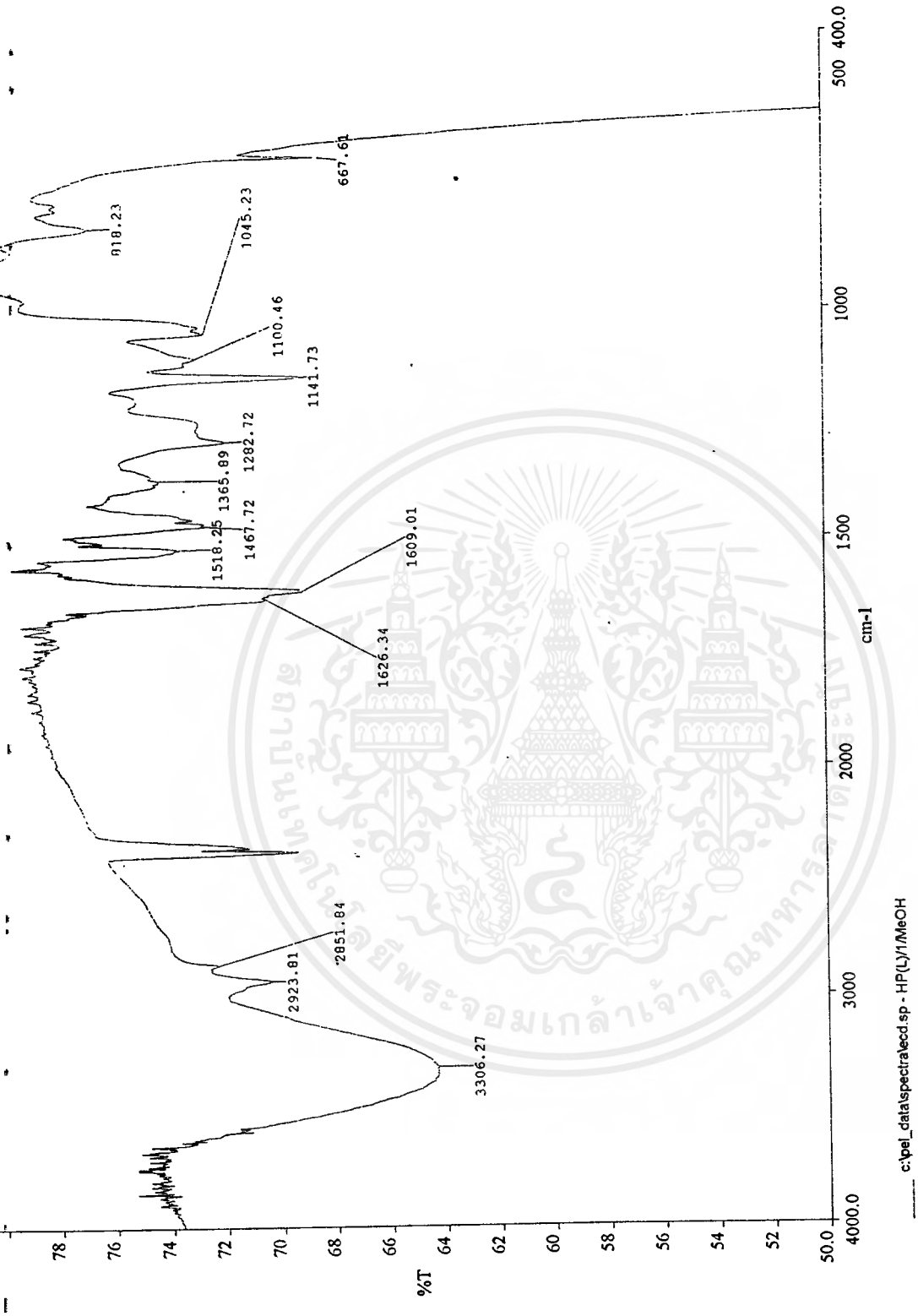
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงค่า ^{13}C chemical shift(δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ดังรูปที่ 4.4 เมื่อใช้ CD_3OD/TMS เป็น solvent

δ (ppm)	พันธะที่น่าจะมีของสาร
29	$-CH_2-C-$ (C secondary)
69.5, 83.5, 96, 97	CH-O- (C tertiary)
101.5	-C-O- (C quaternary)
115.8, 116.5, 120.5	-CH=CH- aromatic (C tertiary)
132.5, 146.8, 157.3, 157.95, 158.3	Ph-O-C- (C quaternary)

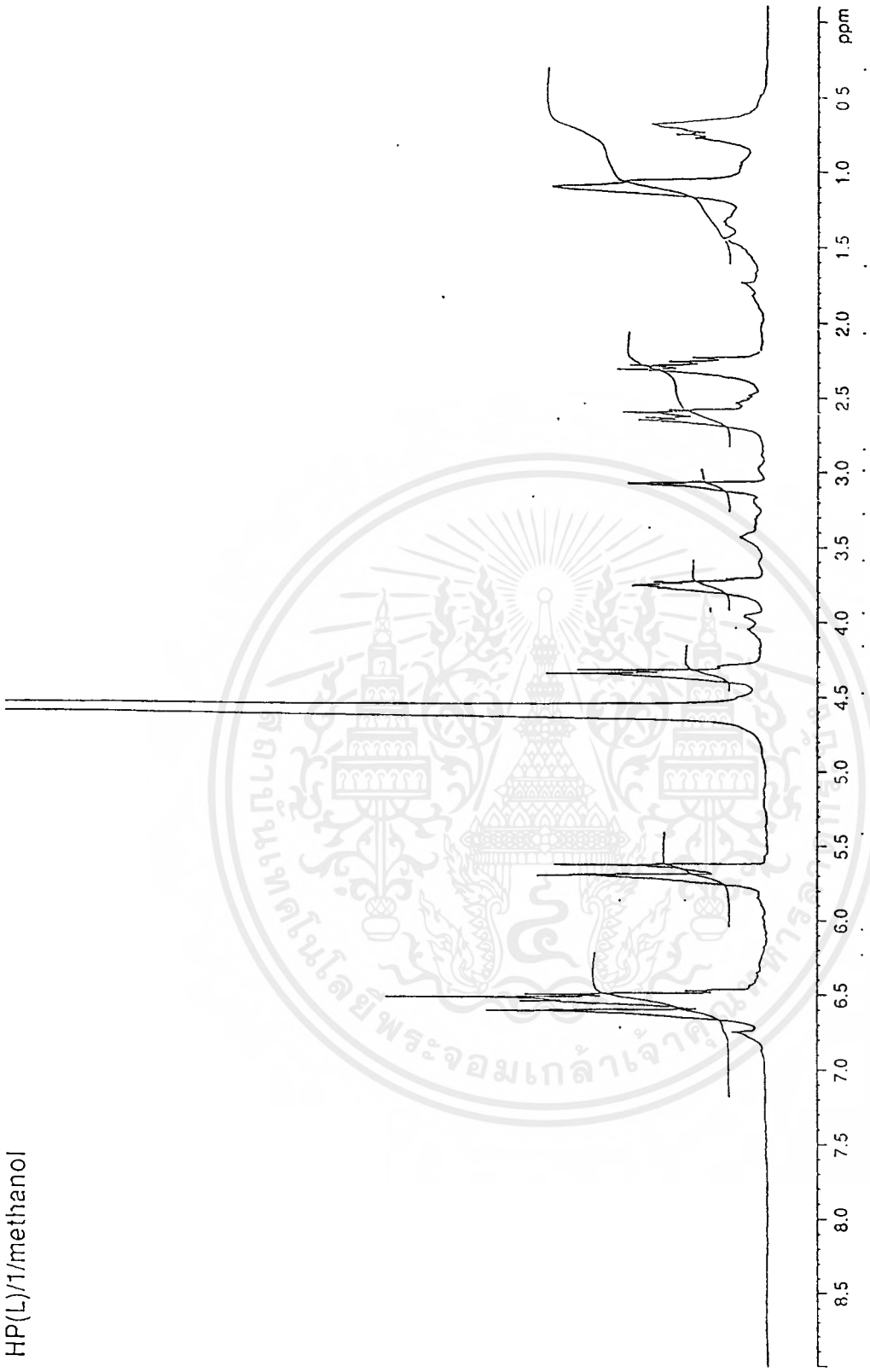
จากข้อมูลทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร HP(L)/1/MeOH น่าจะมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 14 ตัว มีวงแหวน aromatic และหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



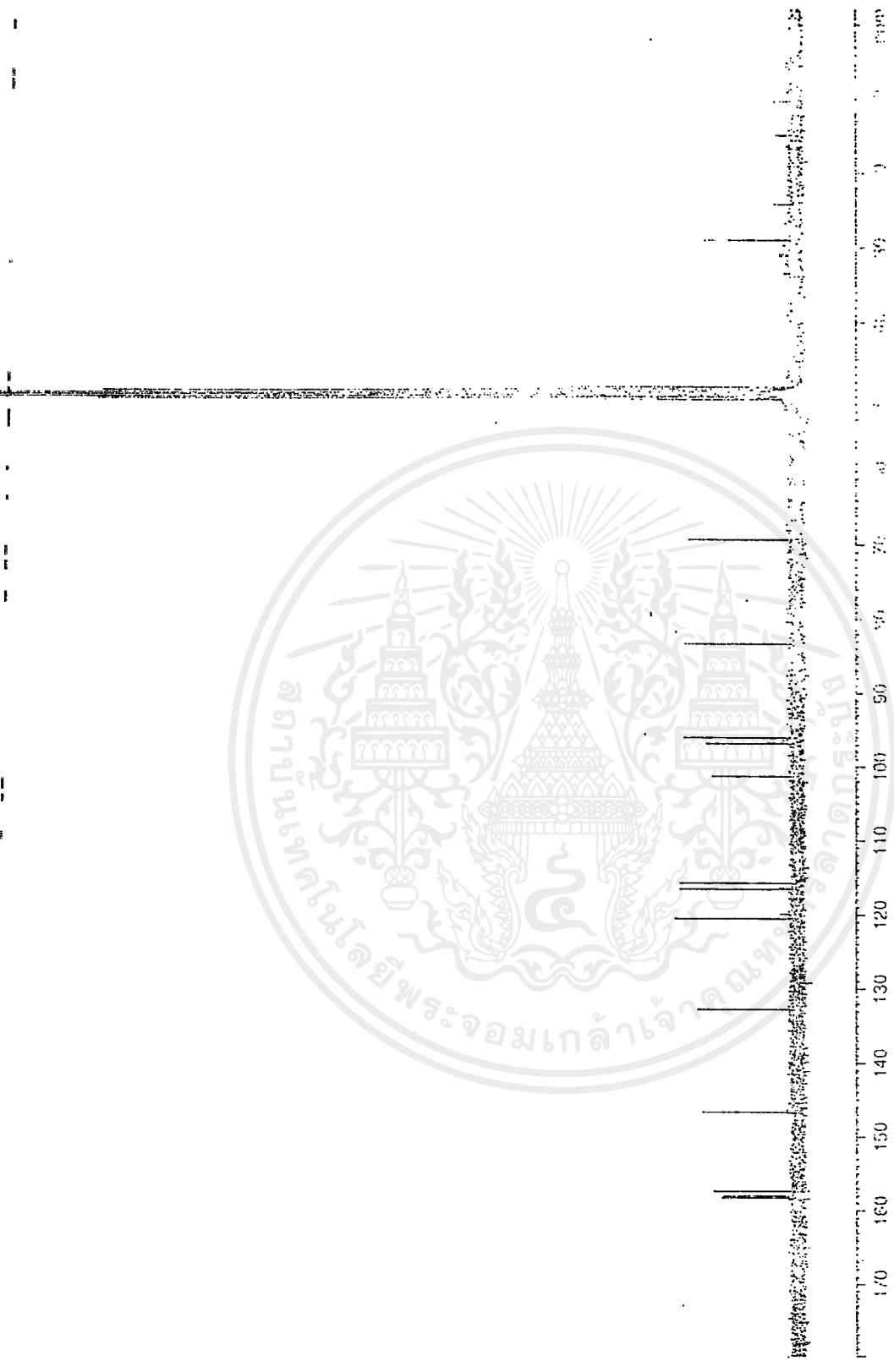
รูปที่ 4.2 FT-IR spectrum ของ HP(L)/1/MeOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ^{1}H NMR spectrum ของ HP(L)/1/MeOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ^{13}C NMR spectrum ของ HP(L)/1/MeOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 HP(L)/1/$CHCl_3$

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

ตารางที่ 4.15 แสดงผลการตรวจสอบด้วย TLC และdeveloping solvent

ผลจาก TLC	ตาเปล่าไม่พบ, UV. พบ 1จุด มีสีม่วง DS. มีสีม่วงเข้ม
R_f	0.91
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็งสีเหลือง

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR

ตารางที่ 4.16 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก FT-IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ จากรูปที่ 4.5

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
2917.09-2849.07	C-H stretching
1726.14	C=O stretching
1462.32-1377.96	C-H bending ของ CH_2, CH_3
734.37	C=C แบบ cis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

ตารางที่ 4.17 แสดงค่า ^{1}H chemical shift(δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ดังรูปที่ 4.6 เมื่อใช้ $CDCl_3$ เป็น solvent

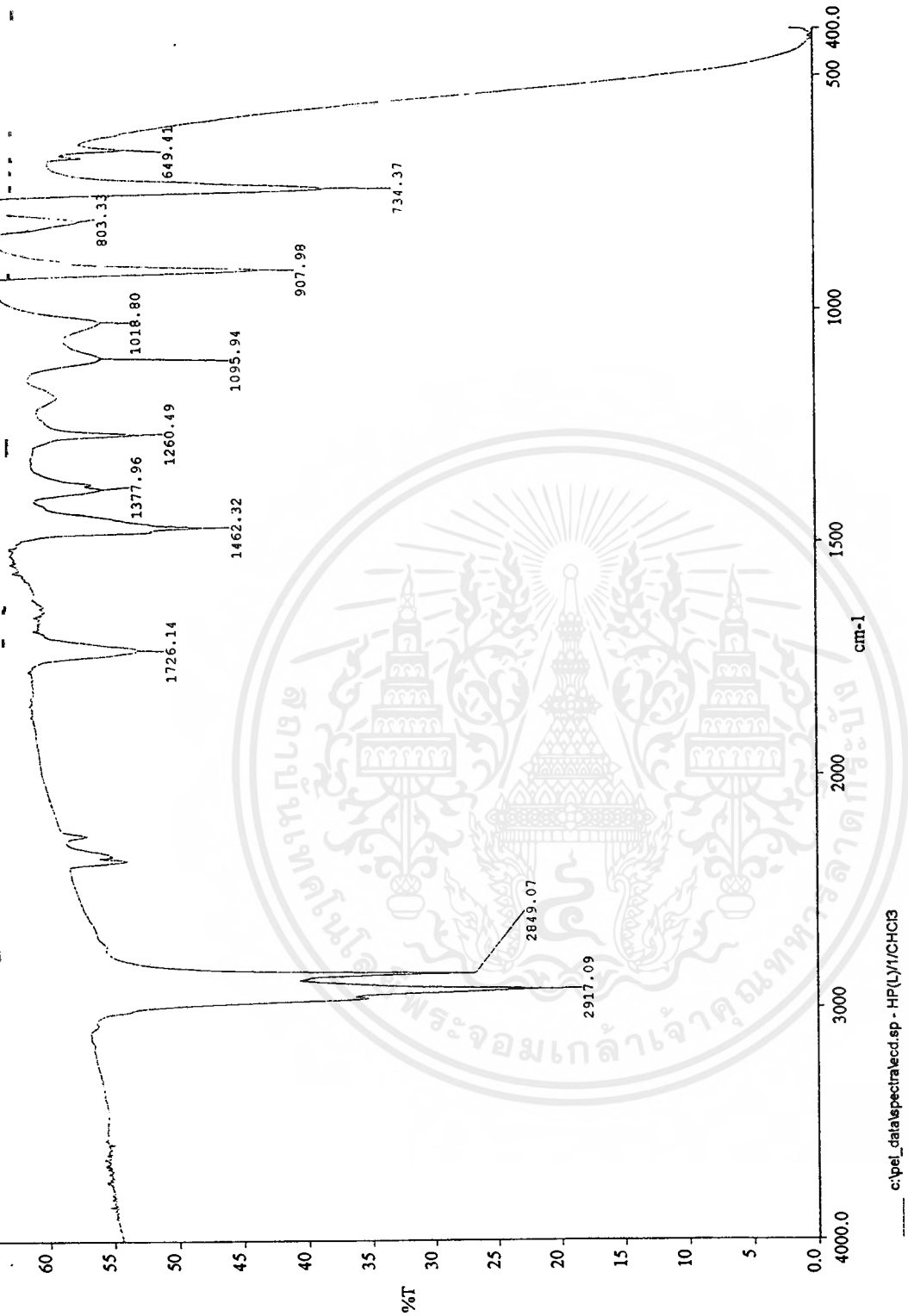
δ (ppm)	พันธะที่น่าจะมีของสาร
5.3-5.5	$C\underline{H}_2$= , $C\underline{H}$=
3.5-3.7	$C\underline{H}_3$-O-
2.0-2.5	O=C-$C\underline{H}_3$
1.5-2.0	$C\underline{H}_3$-C=
1.2-1.5	-$C\underline{H}_2$-
0.7-1.2	$C\underline{H}_3$-

ตารางที่ 4.18 แสดงค่า ^{13}C chemical shift(δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ดังรูปที่ 4.7 เมื่อใช้ $CDCl_3$ เป็น solvent

δ (ppm)	พันธะที่น่าจะมีของสาร
11.9-36.2	CH_3-C- (C primary)
21.1-42.4	-CH_2-C- (C secondary)
29.2-56.8	-CH-C- (C tertiary)
71.9	-CH-O- (C tertiary)
121.7	-CH=CH- แบบ cis (C tertiary)
140.8	-C-O- เกาะอยู่ในวง หรือเป็นกิ่ง (C quaternary)

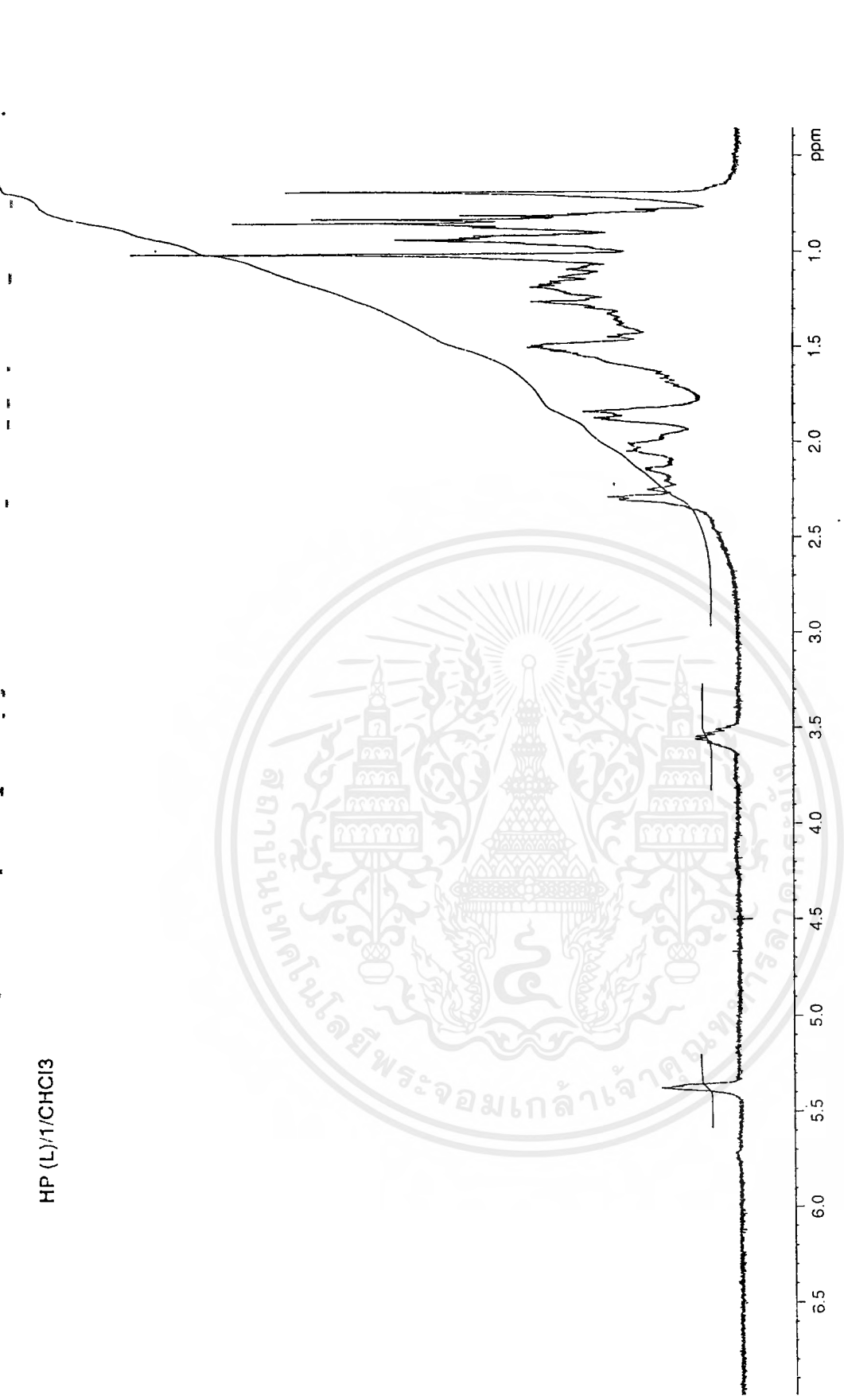
จากข้อมูลทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร HP(L)/1/$CHCl_3$ น่าจะมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 28 ตัว มีโครงสร้างเป็นวง ที่มีพันธะคู่เป็นแบบ cis และมีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่ และหมู่คาร์บอนิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



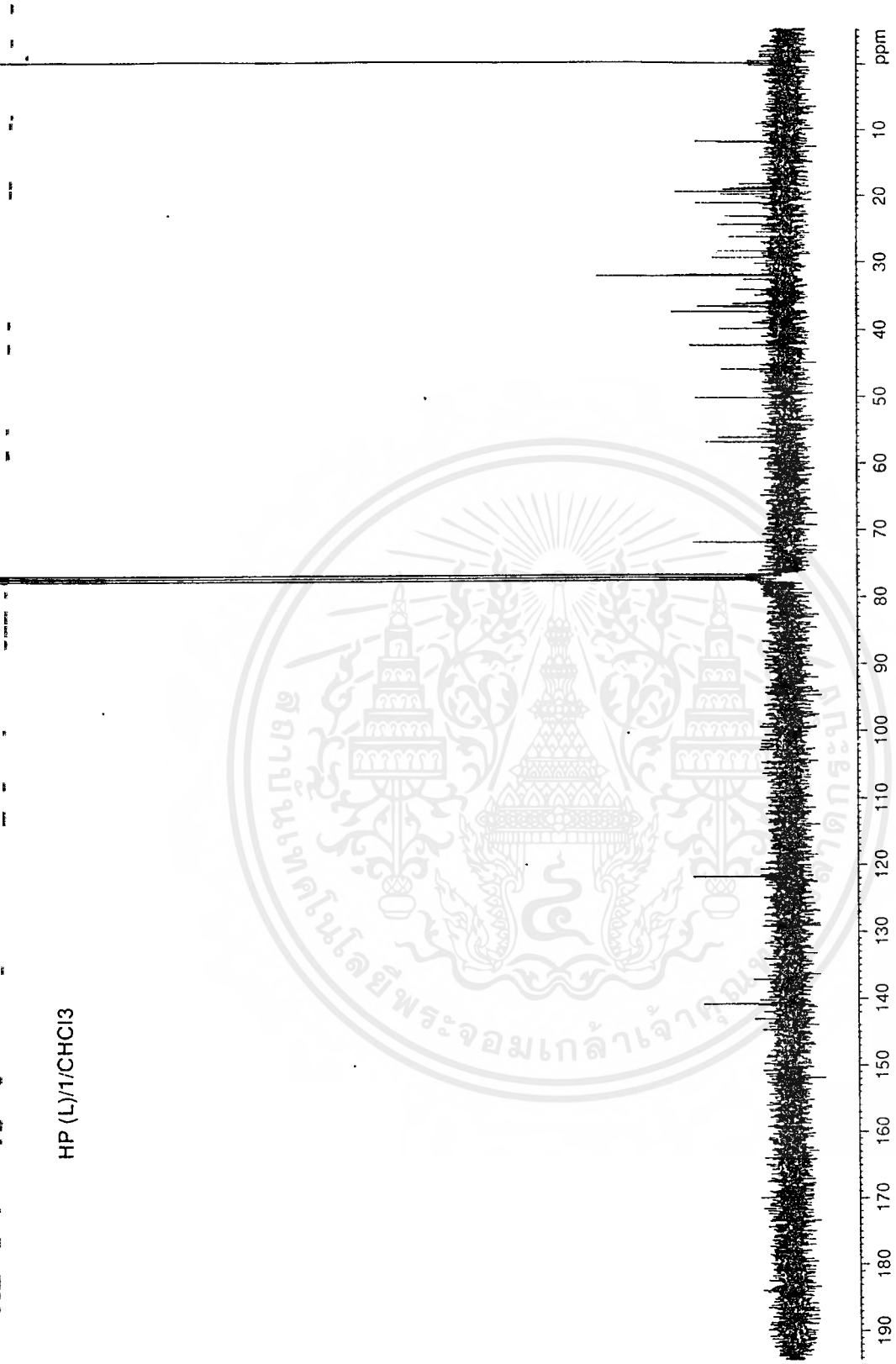
รูปที่ 4.5 FT-IR spectrum ของ HP(L)/1/$CHCl_3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ^{1}H NMR spectrum ของ HP(L)/1/$CHCl_3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ^{13}C NMR spectrum ของ HP(L)/1/$CHCl_3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 HP(L)/1/hex

- ผลการตรวจสอบด้วย TLC และการย้อมด้วย developing solvent

ตารางที่ 4.19 แสดงผลการตรวจสอบด้วย TLC และdeveloping solvent

ผลจาก TLC	ตาเปล่าไม่พบ, UV. พบ 1จุด มีสีม่วง DS. มีสีชมพู
R_f	0.59
ลักษณะของสารที่แยกออกมาได้	ของแข็ง สีขาว

- ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR

ตารางที่ 4.20 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก FT-IR spectrum และหมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็นที่ค่า ν_{max} นั้นๆ จากรูปที่ 4.8

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3338.66	O-H stretching
2960.39-2867.89	C-H stretching
1641.32	C=C stretching
1023.92	C-O stretching

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

ตารางที่ 4.21 แสดงค่า ^{1}H chemical shift(δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ดังรูปที่ 4.9 เมื่อใช้ $CDCl_3$ เป็น solvent

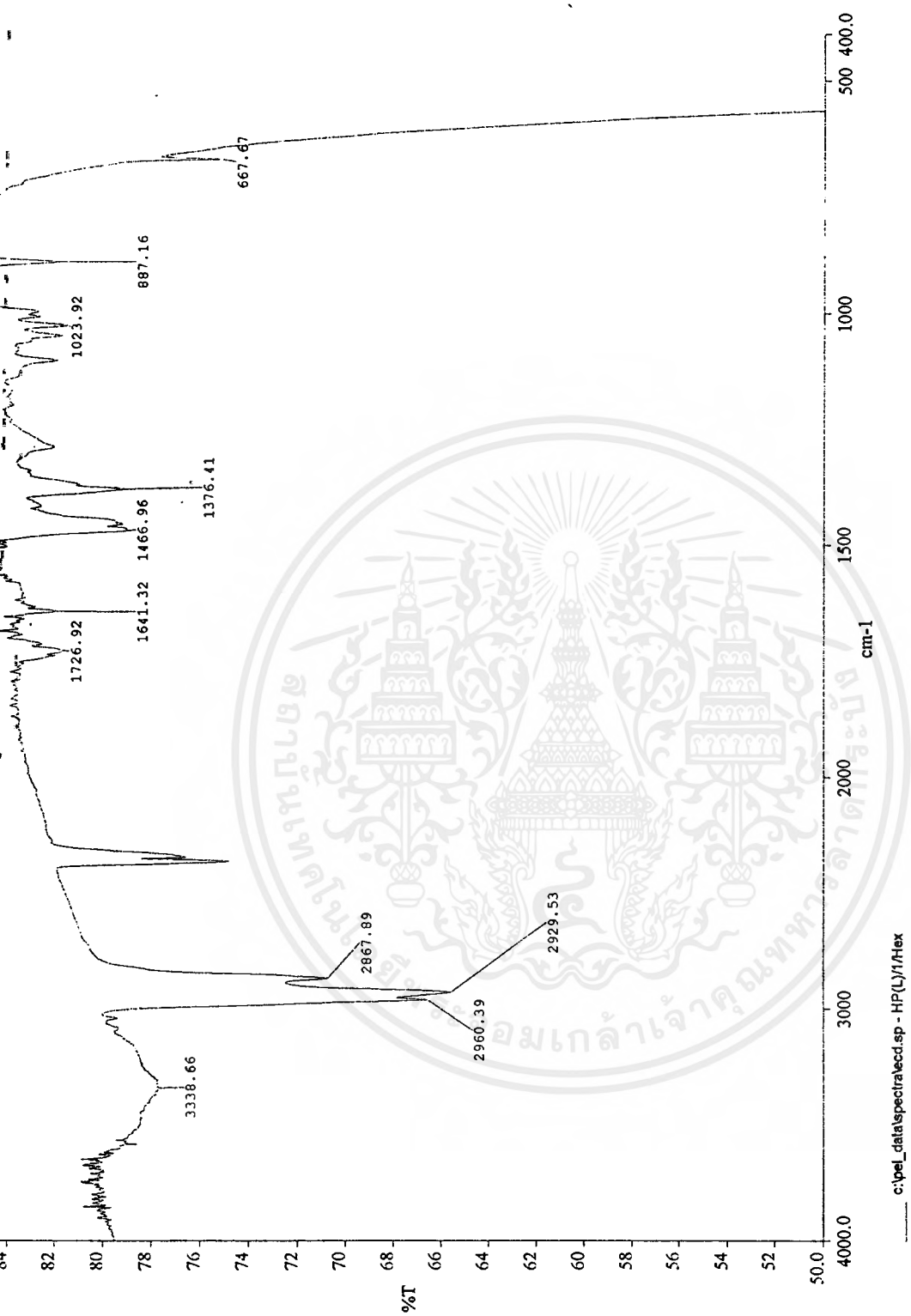
δ (ppm)	พันธะที่น่าจะมีของสาร
4.5-5.0	HC-O-
3.1-3.5	H_3C-C-O-
1.5-2.5	H_3C-C=
0.5-1.5	H_2C- , H_3C-

ตารางที่ 4.22 แสดงค่า ^{13}C chemical shift(δ) ที่น่าสนใจ และพันธะที่น่าจะมีของสาร ดังรูปที่ 4.10 เมื่อใช้ $CDCl_3$ เป็น solvent

δ (ppm)	พันธะที่น่าจะมีของสาร
14, 18, 18.5, 19, 22, 25.5	CH_3-C- (C primary)
20, 40.5, 49	-C-C- (C quaternary)
21, 26, 26.5, 28, 29.8, 30, 30.5, 31.5, 32, 33, 35, 35.5	-CH_2-C- (C secondary)
34, 36, 47, 48, 52	-CH-C- (C tertiary)
79	-CH-O- (C tertiary)
84.5	-C-O- (C quaternary)
106	-CH_2-C= (C secondary)
157	-C-C= (C quaternary)

จากข้อมูลทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร HP(L)/1/hex น่าจะมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 31 ตัว มีโครงสร้างโซ่ยาว และมีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่ และหมู่ไฮดรอกซิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

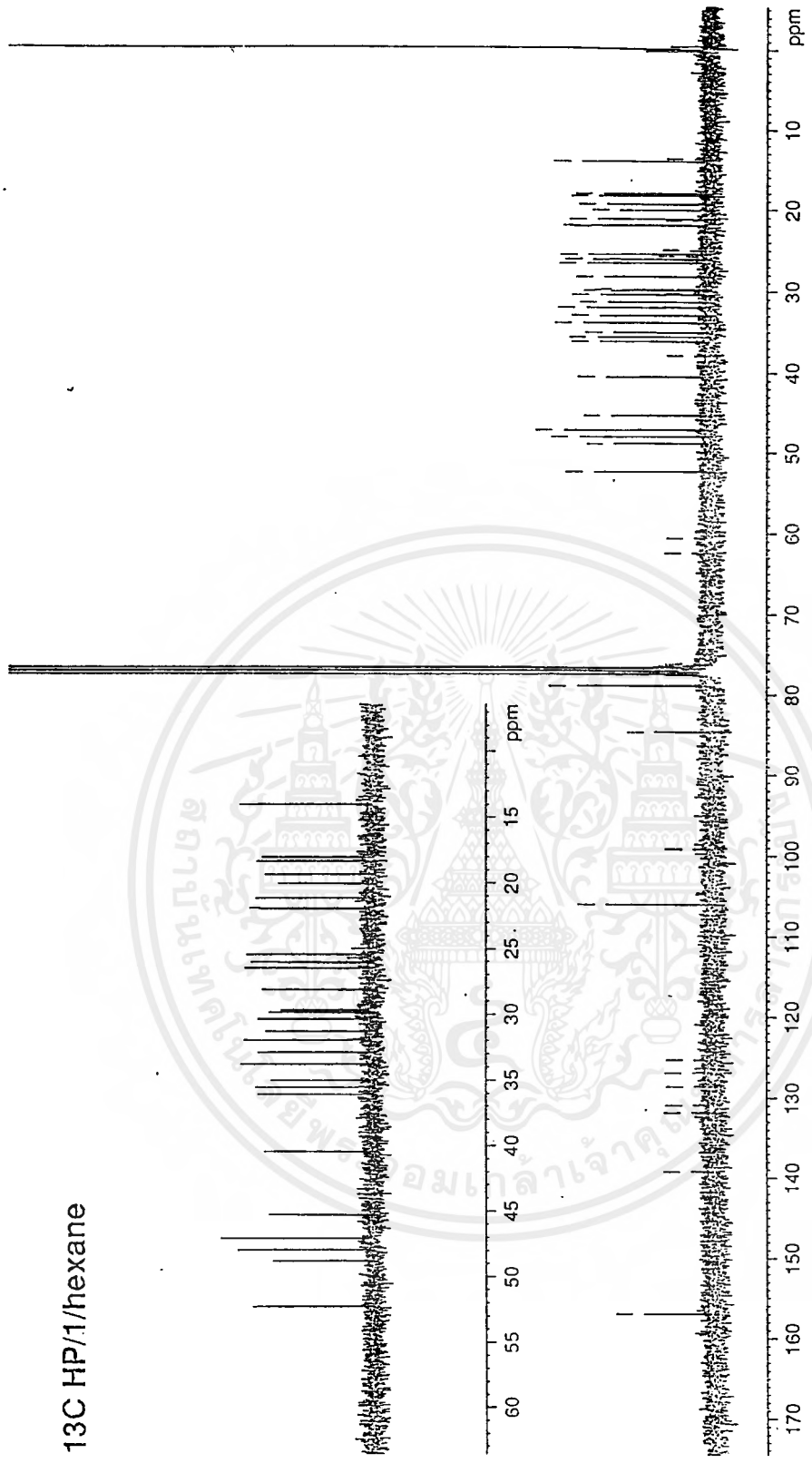


รูปที่ 4.8 FT-IR spectrum ของ HP(L)/1/hex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 ^{1}H NMR spectrum ของ HP(L)/1/hex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ^{13}C NMR spectrum ของ HP(L)/1/hex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. ใบสีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* Merr.) ที่สกัดได้ในชั้น methanol มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียมากที่สุด

2. solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบสารด้วย TLC และใช้เป็นแนวทางในการแยกสารสำคัญด้วย column chromatography คือ
   2.1 ชั้น methanol ใช้ 5 % methanol, 60% chloroform, 35% ethyl acetate และ 3 หยดของ butanol เป็น solvent system
   2.2 ชั้น chloroform ใช้ 15% ethyl acetate, 85% chloroform, และ 3 หยดของ butanol เป็น solvent system
   2.3 ชั้น hexane ใช้ 45% hexane, 50% dichloromethane และ 5% ethyl acetate เป็น solvent system

3. จำนวนสารที่แยกได้ในแต่ละชั้นตัวทำละลาย
   3.1 ชั้น methanol ได้สารสำคัญ 1 ตัว
   3.2 ชั้น chloroform ได้สารสำคัญ 1 ตัว
   3.3 ชั้น hexane ได้สารสำคัญ 1 ตัว

4. ลักษณะของสารที่ได้

สารที่แยกได้ในแต่ละ fraction จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนี้

HP(L)/1/MeOH เป็นของแข็งสีเหลือง $R_f = 0.60$

HP(L)/1/$CHCl_3$ เป็นของแข็งสีเหลือง $R_f = 0.91$

HP(L)/1/hex เป็นของแข็งสีขาว $R_f = 0.59$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี

เนื่องจากในโครงงานพิเศษนี้ ไม่สามารถหาโครงสร้างของสารอย่างละเอียดได้ เพราะผลการศึกษาไม่เพียงพอ แต่สามารถคาดคะเนหมู่ฟังก์ชันนัล และโครงสร้างได้เพียงคร่าวๆ ดังนี้

- คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร HP(L)/1/MeOH น่าจะมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 14 ตัว มีวงแหวน aromatic และหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่

- คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร HP(L)/1/$CHCl_3$ น่าจะมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 28 ตัว มีโครงสร้างเป็นวง ที่มีพันธะคู่เป็นแบบ cis และมีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่ และหมู่คาร์บอนิล

- คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร HP(L)/1/hex น่าจะมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 31 ตัว มีโครงสร้างโซ่ยาว และมีหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญคือ พันธะคู่ และหมู่ไฮดรอกซิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สารสำคัญในใบสีฟันคนทา เมื่อแยกได้สารบริสุทธิ์แล้ว ควรจะมีการนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย
2. ในการแยกสารสำคัญ จะต้องหา solvent system ไม่ควรเกิดปฏิกิริยากับสารสำคัญฯ
3. ในการแยกสารสำคัญออกจาก column ควรเพิ่มความเป็นขั้วของ solvent system ที่ใช้ให้น้อยที่สุด และควรหยุดเพิ่มเมื่อสารสำคัญเริ่มออกจาก column เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารสำคัญ
4. ก่อนการนำสารไปวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิคทาง spectroscopy ควรทำให้สารนั้นมีความบริสุทธิ์ก่อน หรือให้มีสารอื่นเจือปนในปริมาณที่น้อยที่สุด
5. การหา solvent system ที่เหมาะสม ควรหาที่ความเป็นขั้วของสารละลายแตกต่างกันหลายๆ ค่า เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบให้ได้ผลการแยกที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. ร.ศ. วันดี กฤษณพันธ์ . ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 2 . หน้า 37-100, 130-171, ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536.
2. นิจศิริ เรืองรังษี พะยอม ตันติวัฒน์ . พืชสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 1 . หน้า 1-9, สำนักพิมพ์ โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพ ฯ, 2534.
3. ร.ศ. อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ . การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 1 . หน้า 7-194, ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536.
4. เอมอร โสมนะพันธุ์ . ยาจากสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 1 . หน้า 251-272, Text and Journal Corporation Co., 2533.
5. พร้อมจิต ศรลัมพ์ รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์ยามกุล วงศ์ศถิตย์ ฉัวกุล และคณะ . สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ พิมพ์ครั้งที่ 1 . หน้า 117, อัมรินทร์ พริ้นติ้ง กรุ๊ป จำกัด, กรุงเทพฯ, 2535.
6. มนิดา สถิตมั่นในธรรม . จากรวมบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ . หน้า 194, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2534.
7. Thadaniti, Somkiat; Archakunakorn, Wandee; Tuntiwachwuttikul, Pittaya; Bremner, John B. " Chromones form *Harrisonia perforta* (Blance.) Merr." J. Sci. Soc. 20(4). (1994) : 183-187.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้