



บทที่ 3

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำมันไบโอฟริงทั้ง 3 ตัวอย่าง มีสีเหลืองใส พันธุ์เวียดนามมีสีเหลืองเข้มกว่าพันธุ์พื้นเมือง น้ำมันจากไบโอฟริงทั้ง 3 ตัวอย่างมีกลิ่นหอมเหมือนไบโอฟริงสด แต่พันธุ์พื้นเมืองมีกลิ่นแรงกว่าพันธุ์เวียดนาม ปริมาณน้ำมันที่กลั่นได้จากฟรังพันธุ์พื้นเมือง ที่อำเภอกระทุ่มแบน มีผลผลิต (yield) สูงถึง 0.30 % (คิดจากไบโอฟริงสด) ส่วนพันธุ์พื้นเมืองบริเวณตึกเคมี 3 และพันธุ์เวียดนามที่จังหวัดนครปฐมได้ผลผลิต 0.28 % และ 0.15 ตามลำดับ ค่าคงที่ทางกายภาพของน้ำมันทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกันมาก นอกจากค่า optical rotation มีค่า -11.29 ถึง + 15.94 จาก thin layer chromatography ของน้ำมัน 3 ชนิด ลักษณะของ spot บน chromatoplate เหมือนกัน แต่ขนาด spot ไม่เท่ากัน แสดงว่ามีสารเหมือนกันเป็นส่วนใหญ่ แต่ปริมาณของสารต่างกันออกไป

น้ำมันจากไบโอฟริงหลังจากผ่านใน column florisil แล้ว ซึ่งได้จาก fraction ย่อย ๆ นำมารวมกันเป็น 3 fraction ใหญ่ ซึ่งแต่ละ fraction นำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้ gas chromatography / mass spectrometer จาก mass spectra แสดงถึง fragmentation ชนิดต่าง ๆ ซึ่งนำไปเปรียบเทียบกับ standard mass spectrum ปรากฏว่าสารที่ทำการวิเคราะห์ ได้มี 26 สาร ด้วยกัน คิดเป็น 79.08 % ของน้ำมันทั้งหมด (วิเคราะห์โดย gas chromatography)

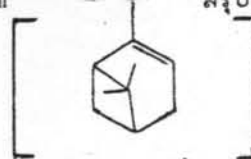
ผลของการวิเคราะห์ G.C. - M.S. ของ peak ที่ 1 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 0.54 % (ดูภาพที่ 9, 10 หน้า 38, 39) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 27, 29, 41, 43, 56, 86, 97, 100 โดยมี base peak ที่ 57 เชื่อว่าน้ำหนักโมเลกุลเป็น 100 จาก fragmentation pattern 27(M-73), 29(M-71), 41(M-59), 43(M-57), 56(M-44), 86(M-14) เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum³³ สรุปได้ว่าสารนี้เป็น saturated hydrocarbon ซึ่งตรงกับสาร 2,2-dimethylpentane ($\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)

G.C.-M.S. ของ peak ที่ 1 ของ fraction ที่ II มีปริมาณ 0.40 % (ตั้งภาพที่ 7,11 หน้า 37,39) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 29, 41, 43, 56, 71, 85, 98, 99, 113, 156 โดยมี base peak ที่ 57 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 156 จาก fragmentation pattern 29(M-127), 41(M-115), 43(M-113) 56(M-100) 57(M-99), 71(M-85) 85(M-71), 98(M-58), 113(M-43) เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum³³ สรุปได้ว่าสารนี้เป็น Saturated hydrocarbon มีชื่อว่า n-undecane ($C_{11}H_{24}$)

G.C.-M.S. ของ peak ที่ 2 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 0.23 % (ตั้งภาพที่ 9,12 หน้า 38,40) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 53, 68, 77, 80, 105, 121, 136 โดยมี base peak ที่ 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 136 จาก fragmentation pattern 41(M-95), 53(M-83), 68(M-68), 77(M-79), 80(M-56), 93(M-43), 105(M-31), 121(M-15)

เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum^{27,30,31} สรุปได้ว่าสารนี้เป็น

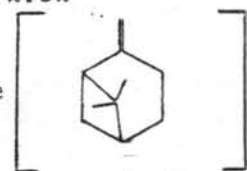
bicyclic monoterpene คือ α -pinene



G.C.-M.S. ของ peak ที่ 3 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 0.06 % (ตั้งภาพที่ 9,13 หน้า 38,40) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 53, 69, 79, 80, 93, 107, 121, 136 โดยมี base peak ที่ 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 136 จาก fragmentation pattern 41(M-95), 53(M-83), 69(M-67), 79(M-57), 80(M-56), 93(M-43), 107(M-33), 121(M-15)

เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก computer^{27,30,31} แสดงว่าสารนี้เป็น

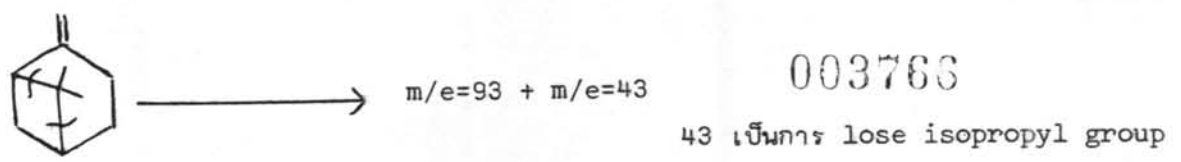
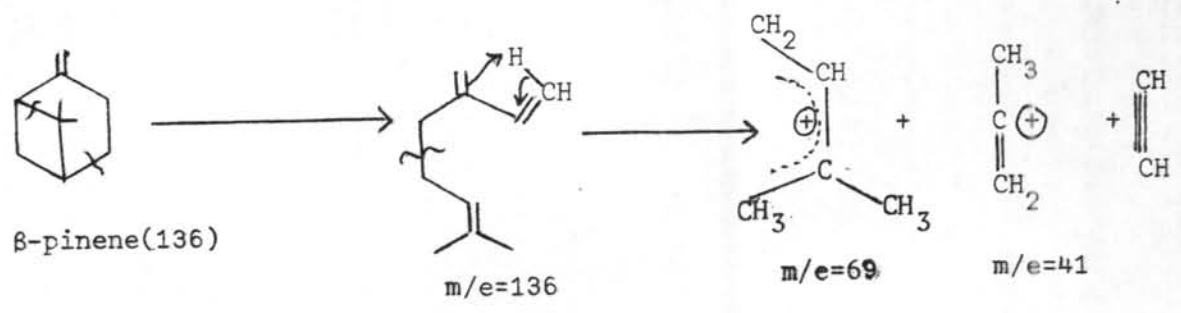
bicyclic monoterpene hydrocarbon คือ β -pinene



ซึ่ง A.F., Thomas³⁰ ได้ทำการเสนอ fragmentation pattern ของ β -pinene



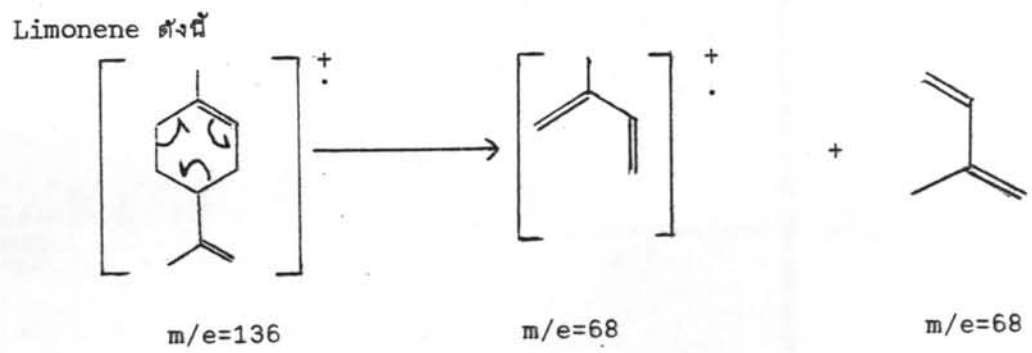
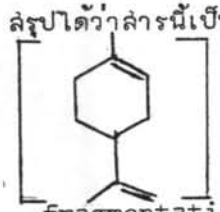
แสดงให้เห็นดังนี้

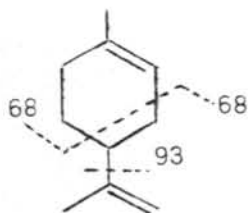


G.C. - M.S. ของ peak ที่ 1,4 ของ fraction ที่ I, III มีปริมาณ 3.68% (ดังภาพที่ 6, 9, 13 หน้า 36, 37, 41) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 53, 68, 79, 93, 107, 121, 136 โดยมี base peak ที่ 68 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 136 จาก fragmentation pattern 41(M-95), 53(M-83), 68(M/2), 79(M-57), 93(M-43), 107(M-33), 121(M-15)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum^{27,30,31} สรุปได้ว่าสารนี้เป็น monocyclic monoterpene hydrocarbon คือ Limonene

A.F. Thomas³⁰ และ Ryhage³¹ ได้ทำการเล่น ไลโมนีนได้รูปแบบการแตกตัวของ

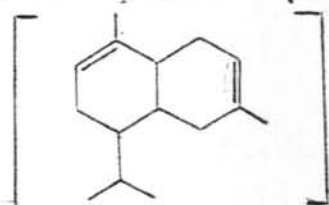




68(M/2), 93(M-43), 107(M-29), 121(M-15)

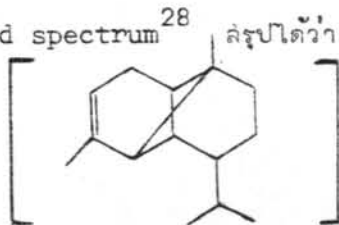
G.C. - M.S. ของ peak ที่ 2 ของ fraction ที่ I มีปริมาณ 0.4 % (ตั้งภาพที่ 6,14 หน้า 36,41) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 43, 69, 71, 91, 93, 105, 119, 121, 189, 204 โดยมี base peak ที่ 161 น้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 43(M-161), 69(M-135), 72(M-133) 91(M-113), 93(M-111), 105(M-99), 121(M-83), 161(M-43), 189(M-15)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern²⁸ ซึ่งแนะนำโดย computer เมื่อเปรียบเทียบกับ standard spectrum ลึกลับได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene hydrocarbon คือ Cardinine

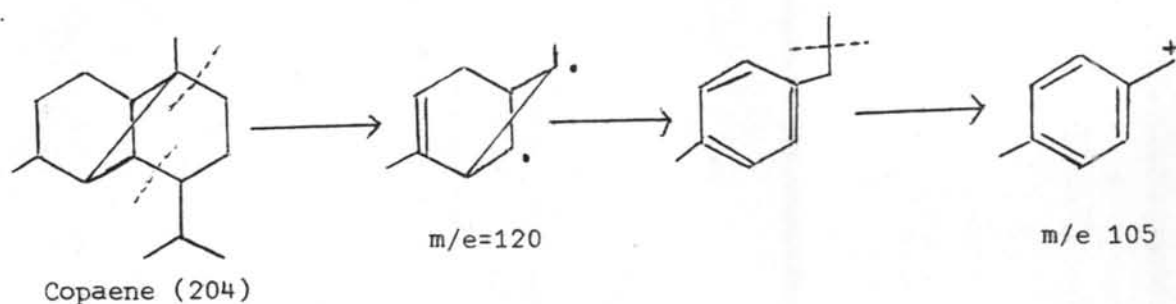


G.C. - M.S ของ peak ที่ 5 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 0.34 % ของ น้ำมันทั้งหมด (ตั้งภาพที่ 9,15 หน้า 38,42) พบว่ามี fragmentation ที่สำคัญดังนี้ 41, 55, 69, 81, 83, 93, 105, 120, 161, 189, 204 โดยมี base peak ที่ 161 สารนี้มี น้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 55(M-149), 69(M-135), 81(M-123), 83(M-121), 93(M-111), 105(M-99), 120(M-84), 161(M-43), 189(M-15)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และ จากการเปรียบเทียบกับ standard spectrum²⁸ ลึกลับได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene hydrocarbon คือ Copaene Yoshiro Hirose²⁶

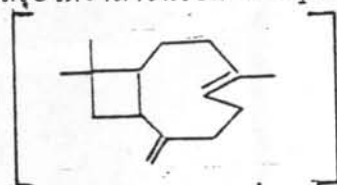


ได้เล่นือ fragmentation pattern ของ Copaene ดังนี้



G.C.-M.S. ของ peak ที่ 3,6 ของ fraction ที่ I, III มีปริมาณ 21.21 % ดังภาพที่ 6,9,16 หน้า 36,38,42) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 69, 79, 91, 93, 107, 120, 133, 147, 148, 161, 189, 204 โดยมี base peak ที่ 41 น้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern ที่ 41(M-163), 69(M-135), 79(M-125), 91(M-113), 93(M-111), 107(M-97), 120(M-84), 133(M-71), 147(M-57), 148(M-56), 161(M-43), 189(M-15)

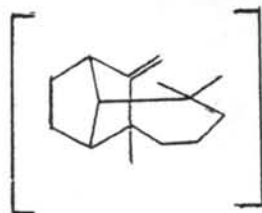
เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene hydrocarbon คือ β -caryophyllene^{27,28,29}



G.C.-M.S. ของ peak ที่ 4,7 ของ fraction ที่ I, III มีปริมาณ 6.78 % (ดังภาพที่ 6,9,17 หน้า 36,38,43) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 55, 69, 81, 91, 93, 105, 107, 119, 121, 133, 135, 147, 148, 162, 189, 204 ซึ่งมี base peak เป็น 161 มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 55(M-149), 69(M-135), 81(M-123), 91(M-113), 93(M-111), 105(M-99), 107(M-97), 119(M-85), 121(M-83), 133(M-71), 135(M-69), 147(M-57), 148(M-56), 162(M-44), 189(M-15)

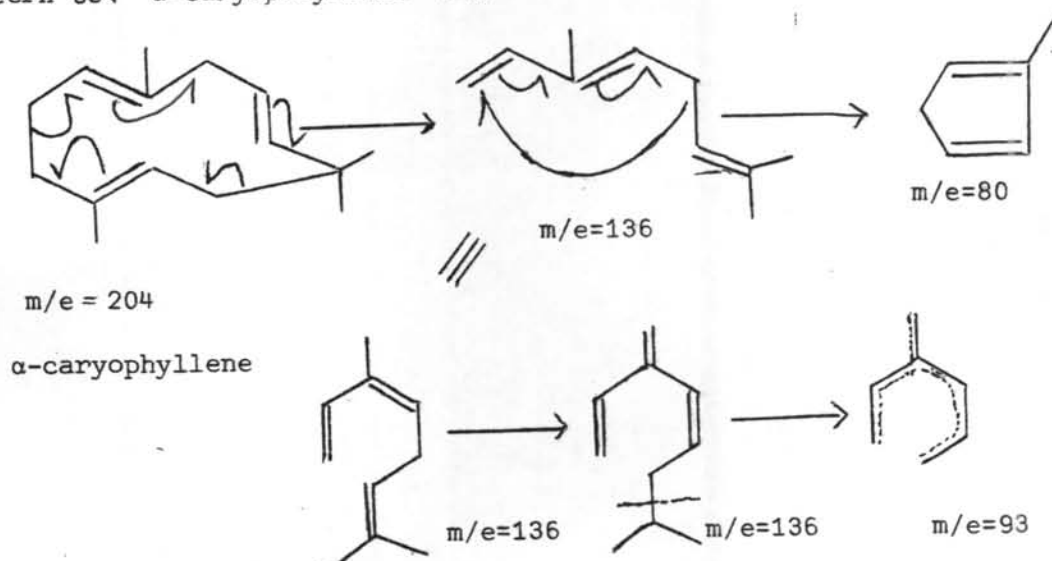
เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum²⁹ สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene hydrocarbon

มีชื่อว่า Longifolene



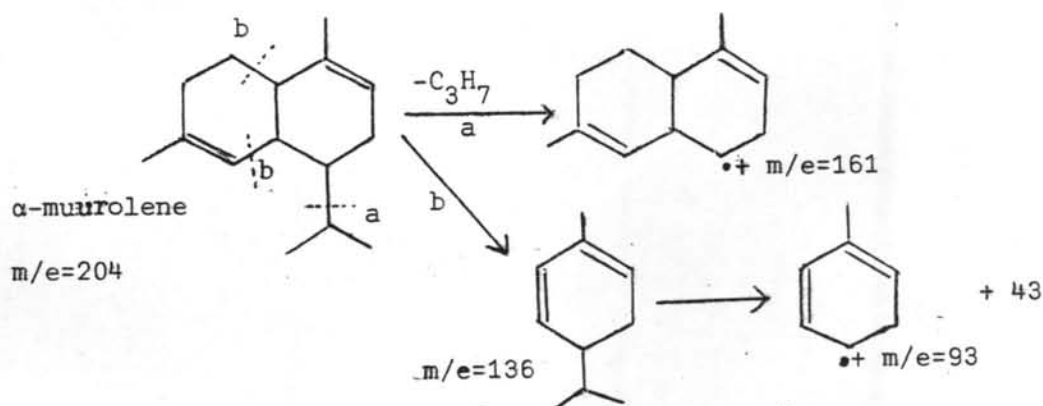
G.C.-M.S. ของ peak ที่ 5 ของ fraction ที่ I มีปริมาณ 1.29 % ของน้ำมันทั้งหมด (ดังภาพที่ 6, 18 หน้า 36, 43) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 53, 67, 80, 93, 121, 136, 204 โดยมี base peak ที่ 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 53(M-151), 67(M-137), 80(M-124), 93(M-111), 121(M-83), 136(M-68)

เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum^{27,28,29} สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene hydrocarbon คือ α -caryophyllene ซึ่ง Yoshiro Hirose²⁶ ได้เสนอ fragmentation pattern ของ α -caryophyllene ดังนี้



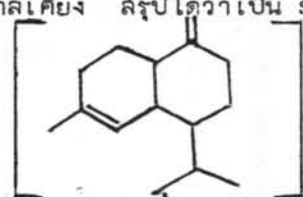
G.C.-M.S. ของ peak ที่ 6, 10 ของ fraction ที่ I, III มีปริมาณ 9.14 % ของน้ำมันทั้งหมด (ดังภาพที่ 6, 9, 19 หน้า 36, 38, 44) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 55, 67, 69, 81, 93, 109, 119, 121, 133, 161, 189, 204 โดยมี base peak ที่ 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 55(M-149), 67(M-137), 69(M-135), 81(M-123), 93(M-111), 109(M-95), 119(M-85), 121(M-83), 133(M-71), 161(M-43), 189(M-15)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ spectrum²⁸ ของสารใกล้เคียง สรุปได้ว่า สารนี้เป็น sesquiterpene hydrocarbon คือ α -muurolene จาก fragmentation pattern ของ Yoshiro Hirose²⁶ นำไปเปรียบเทียบกับของ α -muurolene จึงคาดว่า fragmentation pattern ของ α -muurolene ควรเป็นดังนี้



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 8 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 1.6 % ของ น้ำมันทั้งหมด (ดังภาพที่ 9, 20 หน้า 38, 44). พบว่ามี fragmentation pattern สำคัญดังนี้ 41, 55, 69, 79, 81, 93, 105, 107, 119, 121, 147, 148, 161, 189, 204, โดยมี base peak 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 55(M-149), 69(M-135), 79(M-125), 81(M-123), 93(M-111), 105(M-99), 107(M-97), 119(M-85), 121(M-83), 147(M-57), 161(M-43), 189(M-15)

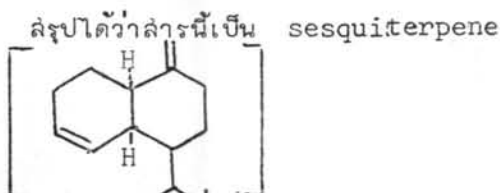
เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ spectrum²⁸ ของสารใกล้เคียง สรุปได้ว่าเป็น sesquiterpene hydrocarbon คือ γ -muurolene



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 9 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 0.08 % ของ น้ำมันทั้งหมด (ดังภาพที่ 9, 21 หน้า 38, 45) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 79, 91, 105, 111, 161, 204 โดยมี base peak 161 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 204

จาก fragmentation pattern 41(M-163), 79(M-125), 91(M-113), 105(M-99), 111(M-93), 161(M-43)

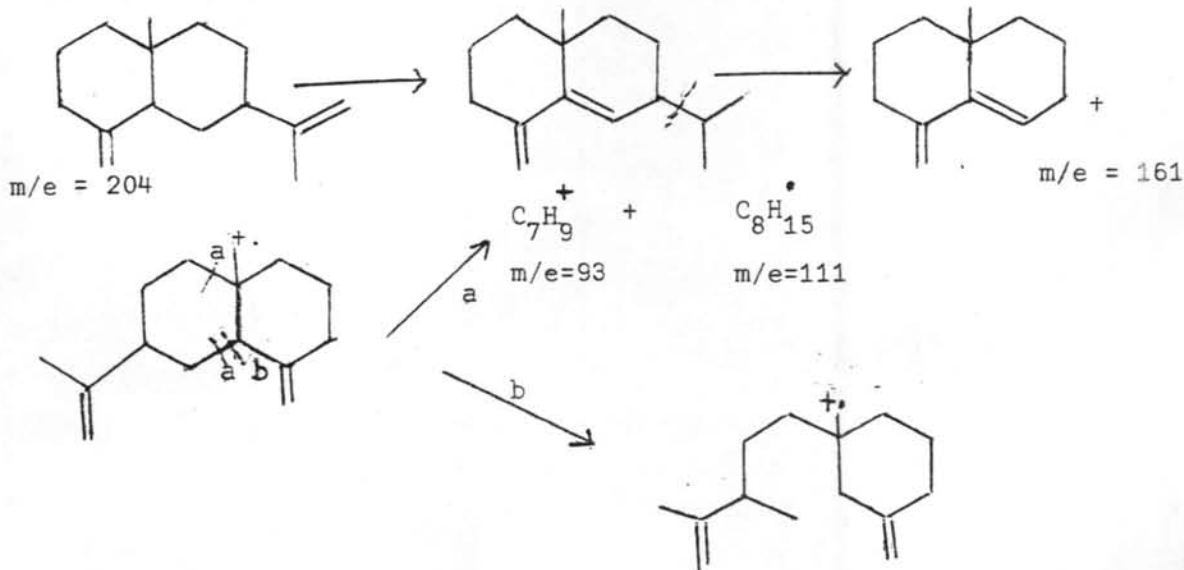
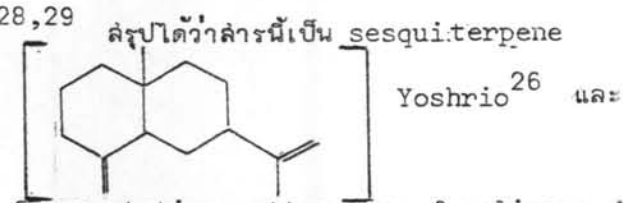
เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum²⁸ hydrocarbon อาจเป็น γ -gardinene.



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 11 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 1.37 %

ของน้ำมันทั้งหมด (ดังภาพที่ 9, 22 หน้า 38, 45) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 55, 67, 81, 93, 107, 111, 121, 135, 161, 189, 204 โดยมี base peak ที่ 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 204 จาก fragmentation pattern 41(M-163), 55(M-149), 67(M-137), 81(M-123), 93(M-111), 107(M-97), 111(M-93), 121(M-83), 135(M-69), 161(M-43), 189(M-15)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum^{28,29} hydrocarbon คือ β -selinene



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 10 ของ fraction ที่ I มีปริมาณ 2.45 % ของน้ำมันทั้งหมด (ตั้งภาพที่ 6,23 หน้า 36,46) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 43, 55, 69, 79, 81, 93, 95, 109, 121, 135, 149, 177, 204, 222 โดย base peak ที่ 41 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 222 จาก fragmentation pattern 41(M-81), 43(M-179), 55(M-167), 69(M-153), 79(M-143), 81(M-141), 93(M-129), 95(M-127), 109(M-113), 121(M-101), 135(M-87), 149(M-73), 177(M-54), 204(M-18), 221

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum²⁹ สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene alcohol โดยมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{22}O$ คิดว่าเป็นพวก sesquiterpene alcohol เพราะมี $m/e = 204(M-18)$ มีการสูญเสียโมเลกุลของน้ำ

G.C. - M.S. ของ peak ที่ 2 ของ fraction ที่ II มีปริมาณ 8.85 % (ตั้งภาพที่ 7,24 หน้า 37,46) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 28, 41, 69, 79, 93, 94, 109, 119, 121, 149, 161, 204, 205, 222 โดยมี base peak ที่ 93 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 222 จาก fragmentation pattern 28(M-194), 41(M-181), 69(M-153), 79(M-147), 93(M-129), 94(M-128), 109(M-113), 119(M-103), 121(M-101), 149(M-73), 161(M-61), 204(M-18)

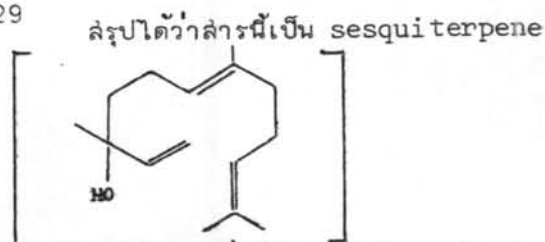
เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum ของสารประเภท sesquiterpene alcohol²⁹ สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene alcohol โดยมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{22}O$ ที่คิดว่าเป็นพวก sesquiterpene alcohol เพราะยังมี $m/e = 204(M-18)$ มีการสูญเสียโมเลกุลของน้ำ

G.C. - M.S. ของ peak ที่ 8, 12 ของ fraction ที่ I, III มีปริมาณ 3.2% (ตั้งภาพที่ 6,9,25 หน้า 36,38,47) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 55, 81, 93, 107, 123, 136, 161, 179, 181, 204, 221, 222 โดยมี base peak ที่ 69 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 222 จาก fragmentation pattern 41(M-181), 55(M-167),

81(M-141), 93(M-129), 107(M-115), 123(M-99), 136(M-86), 161(M-61),
179(M-43), 181(M-41), 204(M-18)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer
และเปรียบเทียบกับ standard spectrum^{27,29} สรุปลงได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene

alcohol คือ Nerolidol



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 13 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 3.65 % (ตั้งภาพ

ที่ 9, 26 หน้า 38, 47) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 55, 69,

81, 93, 109, 123, 135, 136, 161, 204, 205, 222, 239 มี base peak ที่ 43

สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 222 หรือ 264 จาก fragmentation pattern ถ้าคิดจาก

M^+ = 222 41(M-181), 55(M-167), 69(M-153), 81(M-141), 93(M-129), 109(M-113),

123(M-99), 135(M-87), 136(M-76), 161(M-61), 204(M-18)

เมื่อเทียบกับสารที่เป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ที่แนะนำโดย computer และเปรียบ
เทียบกับ standard spectrum^{27,29} สรุปลงได้ว่าสารนี้เป็นไปได้ 2 ตัว คือ

sesquiterpene acetate, sesquiterpene alcohol คือ Farnesyl acetate และ

Farnesol ลักษณะของ fragmentation pattern คล้ายกับ Farnesol แต่จาก

retention time และแนะนำโดย computer น่าจะเป็น Farnesyl acetate มากกว่า

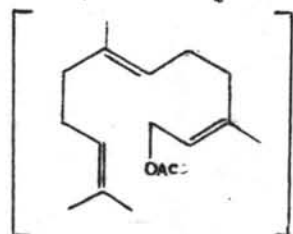
Farnesol เพราะมี m/e ที่ 204(M-60) สูงมาก และ m/e 222(M-42), ซึ่งเป็น

ลักษณะการ fragmentation pattern ของ acetate compound m/e 239 น้อย เพราะ

ปกติ M^+ ของพวก acetate compound ไม่ stable จะ detect M^+ ได้ยากนอกจากจะ

ขยายในช่วงนั้น และมี m/e 43 สูงมาก ซึ่งน่าจะเป็น Farnesyl acetate มากกว่า

Farnesol

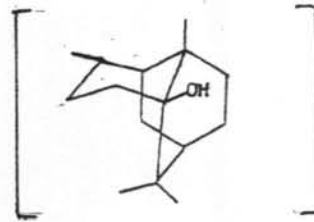


Farnesyl acetate

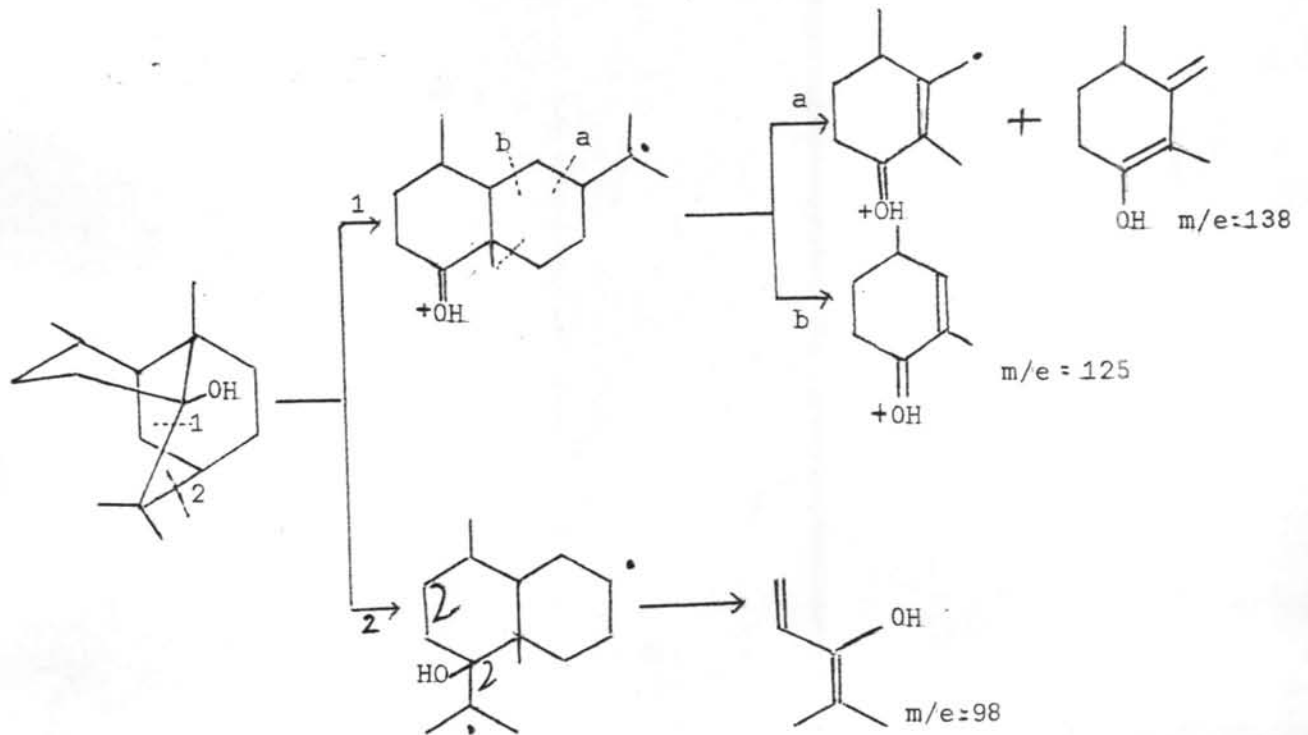
จาก G.C. - M.S. ของ peak ที่ 11 ของ fraction ที่ I มีปริมาณ 1.2% (ดังภาพที่ 6, 27 หน้า 36, 48) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 43, 55, 77, 79, 81, 82, 93, 98, 109, 120, 125, 149, 161, 179, 204, 222 โดยมี base peak ที่ 138 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 222 จาก fragmentation pattern 41(M-181), 43(M-179), 55(M-167), 77(M-149), 79(M-147), 81(M-141) 82(M-140), 93(M-129), 98(M-124), 109(M-113), 120(M-102), 125(M-97), 149(M-73), 161(M-61), 179(M-43), 204(M-18)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum²⁹ สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene alcohol

คือ Patchouli alcohol



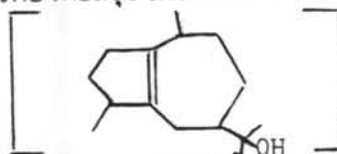
Yoshrio²⁶ ได้ทำการเสนอ fragmentation pattern ของ Patchouli alcohol ดังนี้





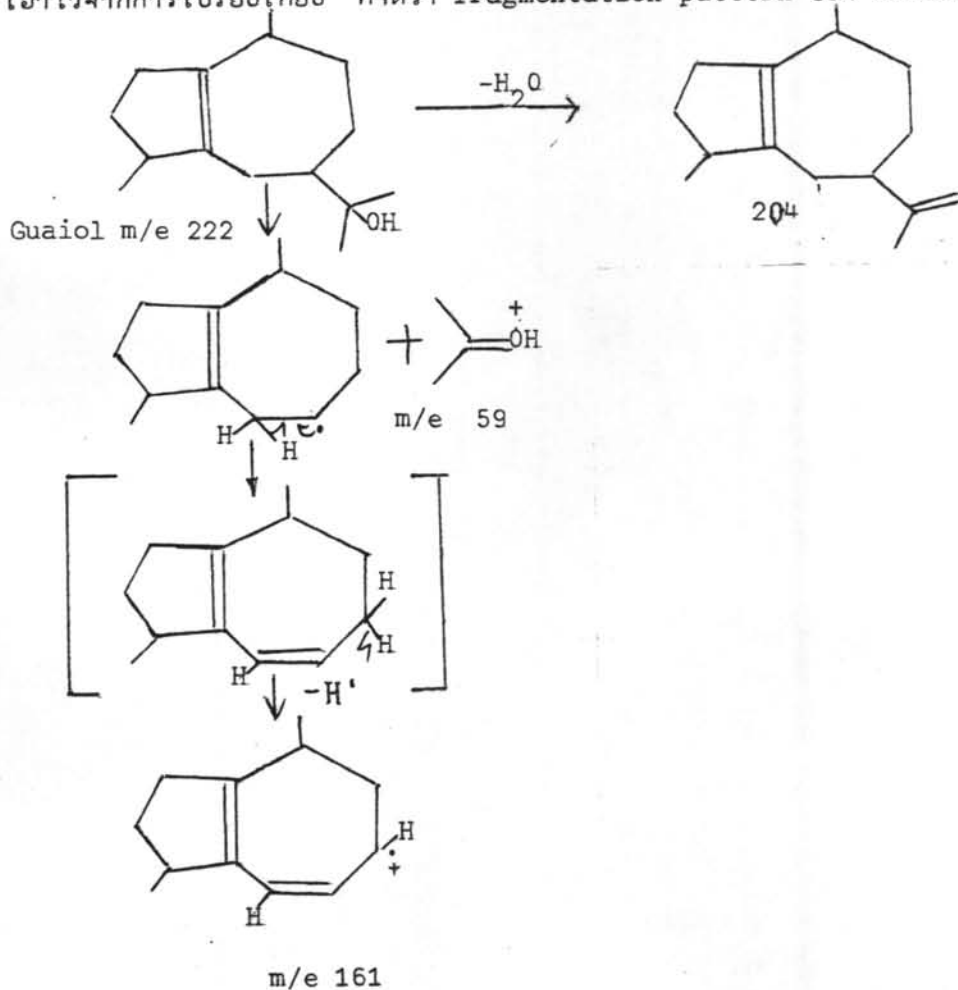
จาก G.C. - M.S. ของ peak ที่ 12 ของ fraction ที่ I มีปริมาณ 1.6 % (ตงภาพที่ 6,28หน้า36,48)พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 43, 55, 69,81, 105, 119, 121, 135, 189, 204, 222 โดยมี base peak ที่ 161 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 222 จาก fragmentation pattern 41(M-181), 43(M-179),55(M-167), 69(M-153), 81(M-141), 105(M-117), 119(m-103), 121(M-101), 135(M-87), 189(M-33), 204(M-18)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum²⁸ ของตัวใกล้เคียงพอสรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene alcohol คือ Guaiol



Yoshrio²⁶ ได้ทำการเสนอ : fragmentation pattern ของอนุพันธ์ของ Guaiol

เอาไว้จากการเปรียบเทียบ คาดว่า fragmentation pattern ของ Guaiol เป็นดังนี้



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 14 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 0.77 % (ตั้งภาพที่ 9, 29 หน้า 38, 49) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 43, 55, 69, 81, 93, 95, 109, 121, 138, 161, 164, 189, 204, 222 โดยมี base peak ที่ 109 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 222 จาก fragmentation pattern 41(M-181), 43(M-179), 55(M-167), 69(M-153), 81(M-141), 93(M-129), 95(M-127), 109(M-113), 121(M-101), 138(M-84), 161(M-61), 164(M-58), 189(M-33), 204(M-18)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern และจากน้ำหนักโมเลกุล 222 สรุปได้ว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{22}O$ และเป็น sesquiterpene alcohol

G.C. - M.S. ของ peak ที่ 15 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 2.42 % (ตั้งภาพที่ 9, 30 หน้า 38, 49) พบว่ามี fragmentation pattern ดังนี้ 41, 43, 55, 69, 81, 93, 107, 119, 135, 161, 189, 204, 220, 222 โดยมี base peak ที่ 136 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 222 จาก fragmentation pattern 41(M-181), 43(M-179), 55(M-167), 69(M-153), 81(M-141), 93(M-129), 107(M-115), 119(M-103), 135(M-87), 161(M-61), 189(M-33), 204(M-18)

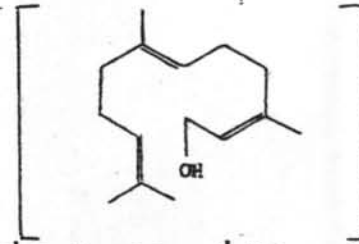
เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern และจากน้ำหนักโมเลกุล 222 สรุปได้ว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{22}O$ และเป็น sesquiterpene alcohol

G.C. - M.S. ของ peak ที่ 16 ของ fraction ที่ III มีปริมาณ 1.58 % (ตั้งภาพที่ 9, 33 หน้า 38, 51) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 41, 43, 55, 69, 82, 93, 95, 107, 119, 123, 133, 150, 161, 183, 198, 204, 220, 222 โดยมี base peak ที่ 82 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เป็นไปได้ คือ 198, 222 จาก fragmentation pattern, M = 198, 41(M-157), 43(M-155), 55(M-143), 69(M-129), 82(M-116), 93(M-105), 95(M-103), 107(M-91), 119(M-79), 123(M-75), 133(M-65), 150(M-48), 161(M-37), 183(M-15)

G.C. - M.S. ของ peak ที่ 5 fraction ที่ II มีปริมาณ 0.46 % (ตั้งภาพที่ 7,32 หน้า 37,50) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 28, 41, 43, 55, 69, 89, 93, 109, 137, 161, 204, 222 มี base peak ที่ 41 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 222 จาก fragmentation pattern 28(M-194), 41(M-181), 43(M-179), 55(M-167), 69(M-153), 81(M-141), 93(M-129), 109(M-113), 137(M-85), 161(M-61), 204(M-18)

เมื่อเทียบกับสารที่อาจเป็นไปได้ตาม fragmentation pattern ซึ่งแนะนำโดย computer และเปรียบเทียบกับ standard spectrum^{27,29} สรุปได้ว่าสารนี้เป็น sesquiterpene

alcohol คือ Farnesol



G.C. - M.S. ของ peak ที่ 6 fraction ที่ II มีปริมาณ 1.85 % (ตั้งภาพ

ที่ 7,34 หน้า 37,51) พบว่ามี fragmentation pattern ที่สำคัญดังนี้ 18, 28, 43, 69, 73, 83, 92, 93, 95, 107, 110, 121, 147, 177, 207, 221, 355, 429 โดยมี base peak ที่ 28 สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 429 หรือ 431 จาก fragmentation pattern น้ำหนักโมเลกุลของสารและการแนะนำโดย computer จึงคาดว่าเป็นพวกสาร (miscellaneous) โดยแนะนำอย่างกว้าง ๆ ว่าสารที่อาจเป็นไปได้ เป็นอนุพันธ์ของ monolinolein หรือ monolinolenin.

จากผลการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยของใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองนี้พบว่ามีองค์ประกอบเป็น aliphatic hydrocarbon 14 สาร คิดเป็น (47.71)% ของน้ำมันเป็น saturated hydrocarbon 2 ชนิด ได้แก่ 2,2 dimethyl pentane และ n-undecane เป็น monoterpenes 3 ชนิด คือ α -pinene, β -pinene และ Limonene Limonene มีปริมาณ 3.68 % ซึ่งเป็นปริมาณมากที่สุด ใน monoterpenes 3 ชนิดนี้ เป็น sesquiterpenes 9 ชนิด ได้แก่ β -caryophyllene, Longifolene, α -caryophyllene, α -muurolene, Cardinene,

γ -muroloene, Copaene, $C_{15}H_{24}$, β -selinene, β -caryophyllene มีปริมาณมากที่สุดของ sesquiterpene และ aliphatic hydrocarbon คือ 21.21 %

ส่วน alcoholic compound มีด้วยกัน 11 สาร คิดเป็น 29.52 % ของน้ำมัน เป็น sesquiterpene alcohol ทั้ง 11 สาร โดยมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{26}O$ สำหรับ สารที่ทราบว่าเป็น sesquiterpene alcohols ชนิดใดมีด้วยกัน 5 สาร คือ Nerolidol, Patchouli alcohol, Guaiol, Cedrol, Farnesol ส่วนที่ทราบเพียงสูตรโมเลกุลจะมีด้วยกัน 6 ชนิด สาร $C_{15}H_{26}O$ ตัวที่ 16 เป็น sesquiterpene alcohol ที่มีปริมาณมากที่สุด ใน alcoholic compound คือ 8.85 %

ส่วน miscellaneous นั้นมี 1 ชนิดมีปริมาณ 1.85 % ของน้ำมัน มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 429 หรือ 431

ผลจากการวิเคราะห์ของน้ำมันใบฝรั่งด้วย gas chromatography/mass spectrometer นั้นได้ 79.08 % เท่านั้น ส่วนที่เหลืออีกประมาณ 20.92 % ยังเป็นปริมาณของน้ำมันที่ยังวิเคราะห์ไม่ได้เนื่องจาก mass spectrum ของสารบางช่วงยังทับกัน และมี impurity ยังแยกจากกันไม่ได้ ดังนั้นการทำครั้งต่อไปจะต้องให้น้ำมันผ่าน florisisil column ให้มีจำนวน fraction มากกว่านี้และรวมเป็น fraction ใหญ่มากกว่า 3 fraction เพื่อสารจะได้แยกจากกันดีขึ้น retention time และลักษณะของ mass spectra ที่แน่นอน ทำให้ resolution ดีขึ้น จากผลของการวิเคราะห์ของน้ำมันใบฝรั่ง β -caryophyllene มีปริมาณมากที่สุดคือ 21.21 % และสารอื่น ๆ ที่มีปริมาณมากรองลงมาได้แก่ α -muroloene (9.14 %) $C_{15}H_{26}O$ (8.85 %), Longifolene (6.74 %) Limonene (3.68 %), Cedrol (3.34 %), Nerolidol (3.2 %) $C_{15}H_{26}O$ (3.65 %)

สารที่ได้จากการวิเคราะห์ของน้ำมันฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งตรงกันกับผู้รายงานเอาไว้แล้ว¹⁷ ได้แก่ α -pinene, Limonene, β -caryophyllene, Longifolene, Nerolidol, β -selinene.

ส่วนสารที่พบซึ่งยังไม่มีผู้รายงานว่ามีในน้ำมันใบฝรั่งได้แก่ 2,2 dimethyl pentane, n-undecane, β -pinene, Copaene, Cardinene, α -caryophyllene, α -muurolene, γ -muurolene, Patchouli alcohol, Guaiol, Cedrol, Farnesol นอกจากนี้ยังมี sesquiterpene alcohol ซึ่งยังไม่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอนอีก 5 สาร และ miscellaneous อีก 1 สาร

β -caryophyllene มีปริมาณมากที่สุด ซึ่งมักจะมีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยทั่วไป และมักมี α -caryophyllene ปนมาด้วย ส่วนใหญ่เข้าไปใช้ประโยชน์ในทางเครื่องหอม³²

ส่วน Limonene นั้นมีถึง 90 % ในน้ำมันของพวก lemon ส่วนประโยชน์³² นำไปใช้เป็นตัวทำลาย, ผลิต resin, wetting และ dispersing agent มีข้อควรระวังว่ามันจะทำให้ผิวเกิดอาการระคายเคืองได้

Cedrol นั้น มีมากในน้ำมันของไม้แก่นสนทร์ ซึ่งมีกลิ่นหอม อาจจะใช้เป็นประโยชน์ในพวกเครื่องหอม

Farnesol นั้นใช้มากในทางเครื่องหอมเพราะมันมีกลิ่นหอมหวานคล้ายดอก lilac

ส่วนสารตัวอื่น ๆ ยังไม่นำมาใช้เดี่ยว ๆ อย่างพวกสารที่กล่าวมาแล้ว ส่วนมากใช้ในลักษณะของของผสม ที่มีอยู่ในน้ำมันชนิดต่าง ๆ เพราะสารพวกนี้มีอยู่กระจายในน้ำมันหอมระเหยทั่ว ๆ ไป

Yaacob, K.B.¹⁸ ได้ศึกษาน้ำมันใบฝรั่งในประเทศมาเลเซีย 3 พันธุ์ โดยศึกษาปริมาณของสารทั้ง 3 ชนิด คือ Limonene, β -caryophyllene และ Longifolene และพยายามสกัดแบ่งชนิดของน้ำมันใบฝรั่งทั้ง 3 พันธุ์ ตามอัตราส่วนของปริมาณสารทั้งสามตาม chemotype ดังนี้

Psidium guajava (var A) - Limonene(30 %) : β -caryophyllene (60 %) type

Psidium guajava (var B) - Limonene (28 %): β -caryophyllene (58 %) :

: Longifolene (8 %) type

Psidium guajava (var C)- β -caryophyllene (30 %) : Longifolene (60 %) type
จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า น้ำมันใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง มีอัตราส่วนประกอบที่สำคัญของ Limonene,
 β -caryophyllene และ Longifolene ดังนี้

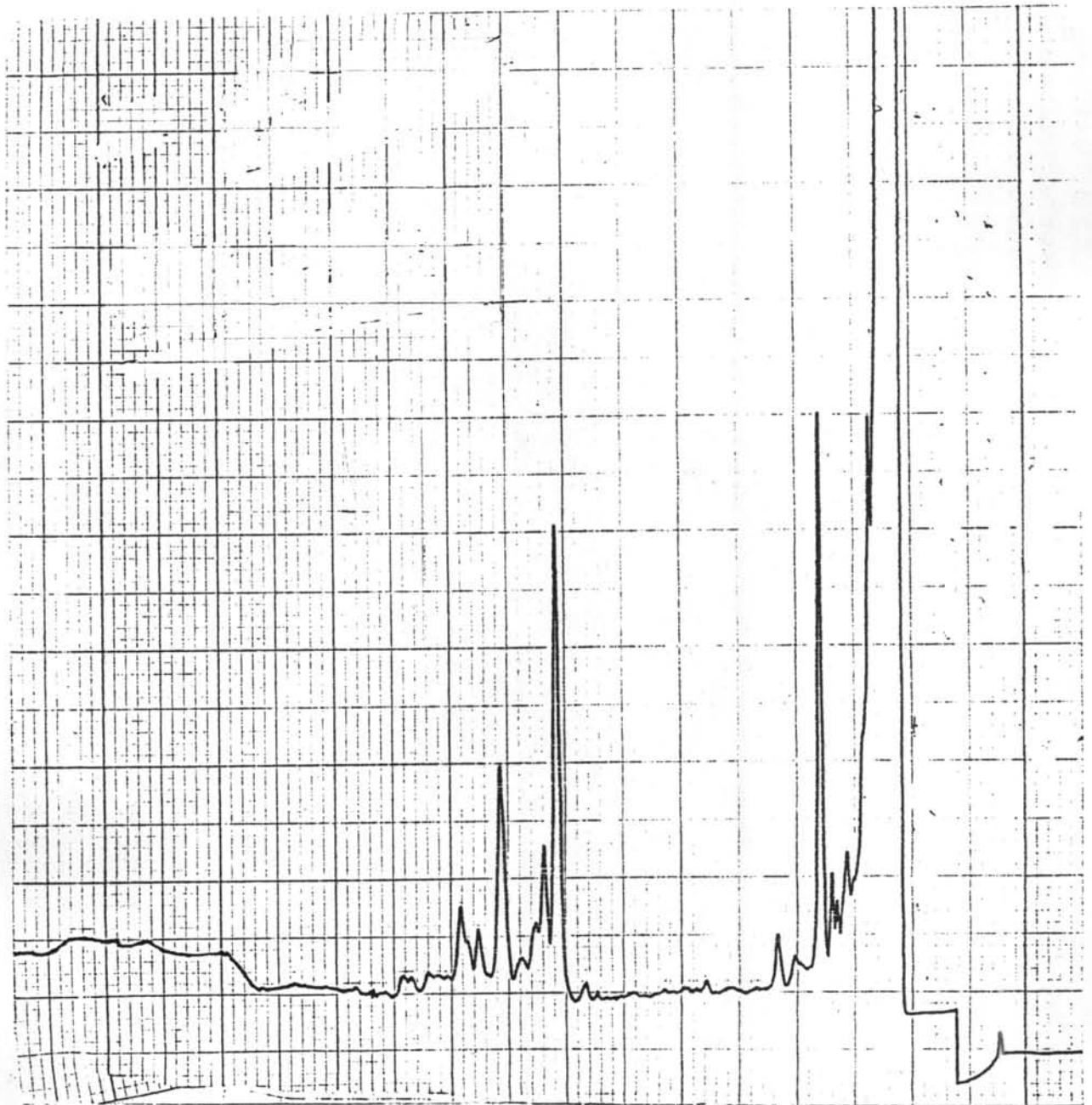
β -caryophyllene (21.21 %) : Longifolene (6.74 %) : Limonene (3.68 %)

เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานของ Yaacob¹⁸ พบว่าอัตราส่วนประกอบของปริมาณสารที่สำคัญ
ไม่ตรงกันกับฝรั่งทั้ง 3 พันธุ์ในประเทศมาเลเซีย แต่จากอัตราส่วนของสารทั้งสามที่มีในน้ำมันใบฝรั่งพันธุ์
พื้นเมืองไทยคล้ายกับฝรั่งมาเลเซียพันธุ์ B เพราะประกอบด้วยสารทั้งสาม คือ Limonene,
 β -caryophyllene, Longifolene แต่มีปริมาณที่ ยังแตกต่างกันมาก

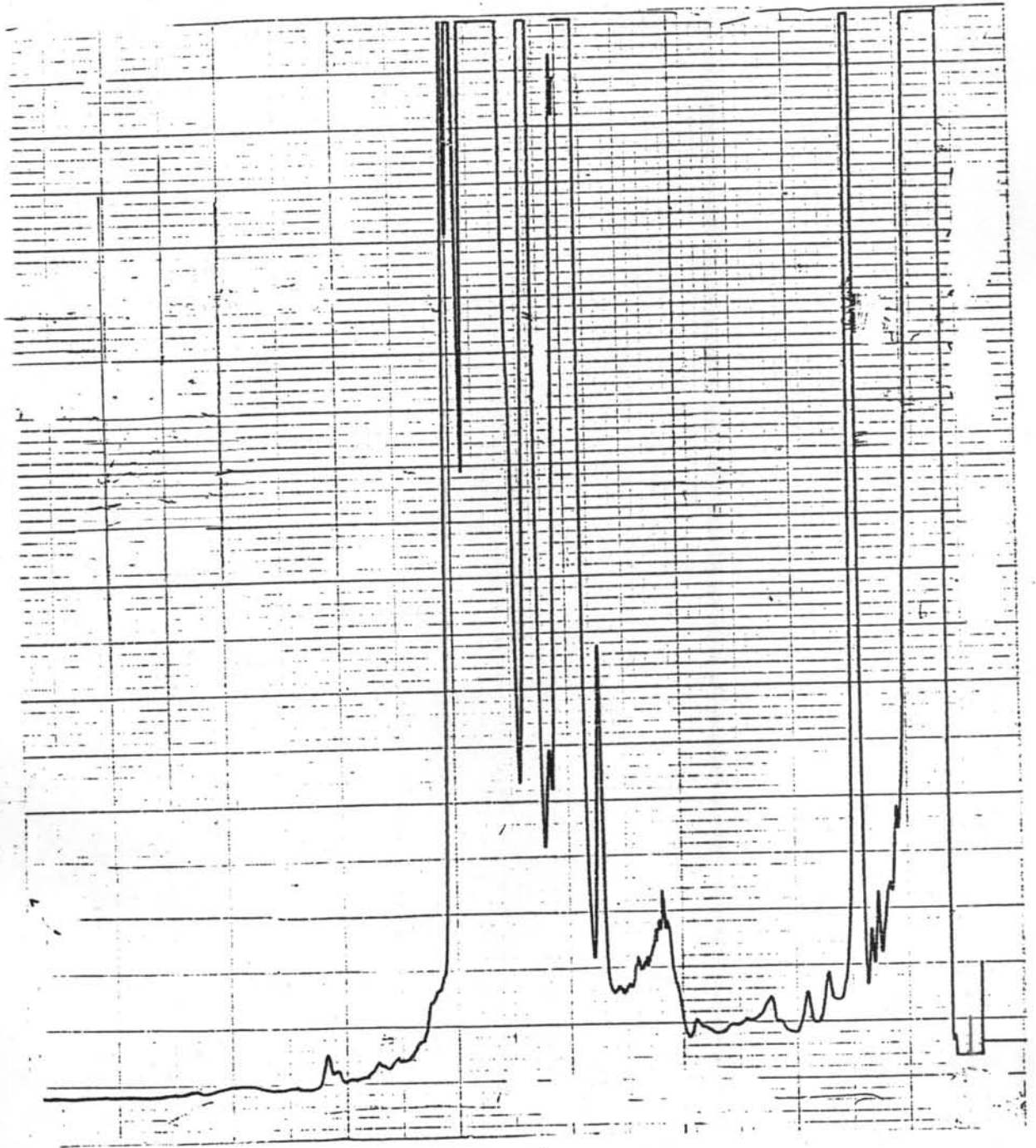
จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบ องค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยในใบฝรั่ง สารบาง
ชนิดถ้ามีปริมาณสูงพอ และมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม อาจจะถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้ ยังใช้เปรียบ
เทียบกับน้ำมันใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม และพันธุ์อื่น ๆ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ทำการวิจัยต่อไป ในการบอก
ความแตกต่างของฝรั่งพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีอยู่มากมายในประเทศไทย เพื่อจัดตั้งชื่อและแบ่งชนิดตามวิธีการ
แบ่งพันธุ์ตามวิธีทางพฤกษศาสตร์ โดยดูจากความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญในน้ำมันใบฝรั่ง เป็นตัวเปรียบเทียบ
เทียบในการแบ่งพันธุ์ฝรั่ง นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการศึกษพบว่าในน้ำมันใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญ
เติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด จากการทดลองเบื้องต้นเชื่อว่าน้ำมันใบฝรั่งอาจมี antifeedant
activity ต่อต้าน boll weevils.

จากการทดลองนี้ทำให้เห็นว่าน้ำมันใบฝรั่ง โดยเฉพาะพันธุ์พื้นเมืองมีผลผลิตสูงถึง 0.30 %
มีกลิ่นสะอาดและหอมมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งอาจมีคุณค่าในการทำเครื่องสำอาง , โลชั่น , ยาสีฟัน
ซึ่งควรมีการทดลองผสมผลผลิตให้ได้อีกเป็นที่นิยมรับของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะ น้ำยาบ้วนปาก ,
ลูกอมดับกลิ่น ลิเปรย์น้ำหอม สบู่อาบน้ำ และอื่น ๆ ส่วนในด้านคุณค่าทางยาของน้ำมันใบฝรั่ง ก็
ควรมีการทำการทดลองอย่างจริงจังในด้าน เป็นยาแก้ท้องเสีย, แก้บิด, ถอนพิษบาดแผล, ดูดกลิ่น
เหม็น, แก้เหงอกบวม, แก้ไข้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง antifeedant activity ต่อ boll
weevils ซึ่งคาดว่าจะทำการทดลองต่อไป

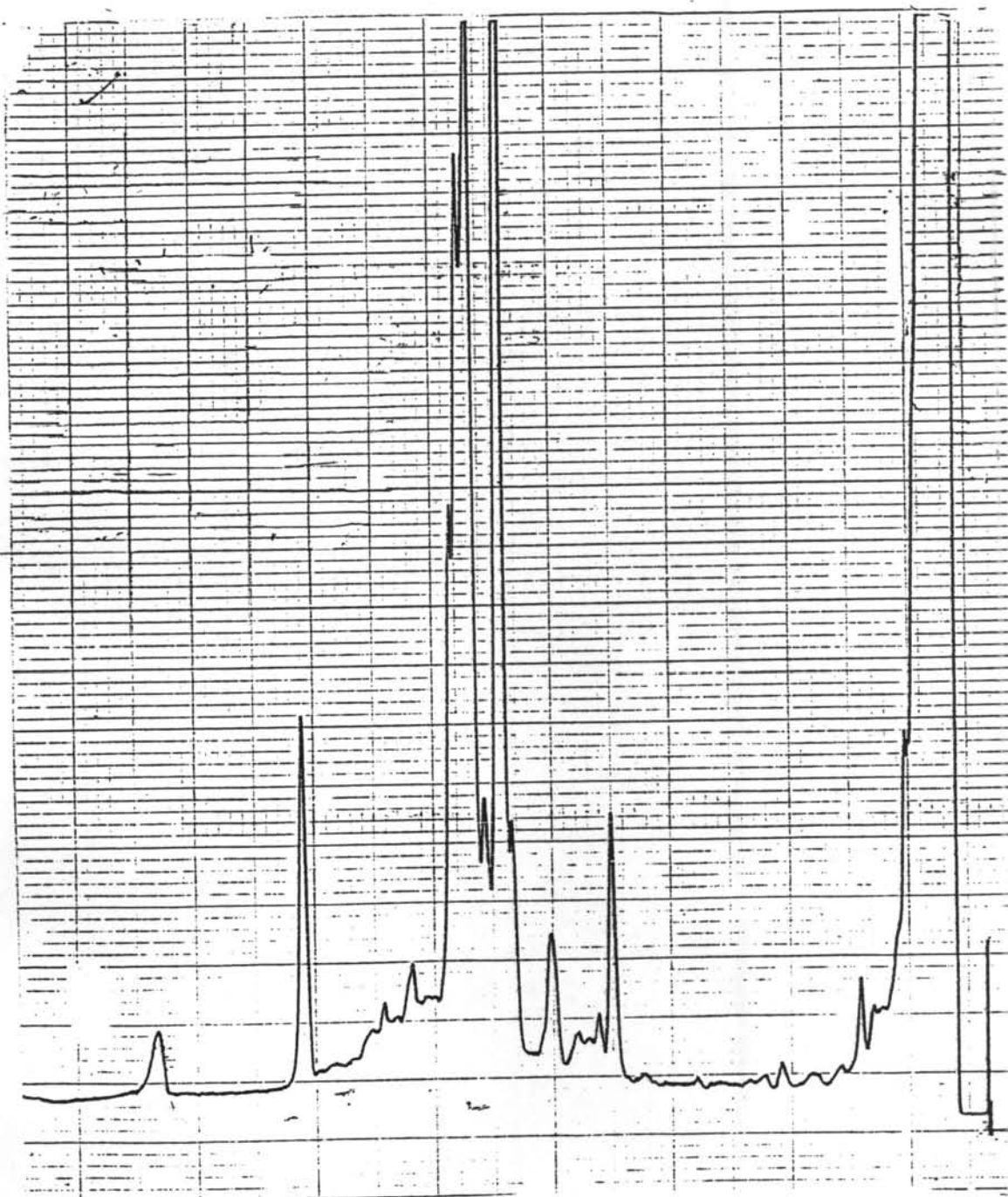
นอกจากนี้ถ้าทราบองค์ประกอบทางเคมีของฝรั่งพันธุ์ต่าง ๆ ก็จะทำให้สามารถ classify ชนิดของ varieties ต่าง ๆ เช่น ฝรั่งพันธุ์ไทยพื้นเมือง, ฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ขาวนิ่ม, กลมล่ำ, กลมอัมพร, กลมทูลเกล้า, ขาวเลว เป็นต้น) ส่วนพันธุ์อื่น ๆ เช่น ฝรั่งจีน, ฝรั่งแดง, ฝรั่งอินเดีย, ฝรั่งออสเตรเลีย ตาม chemotype.



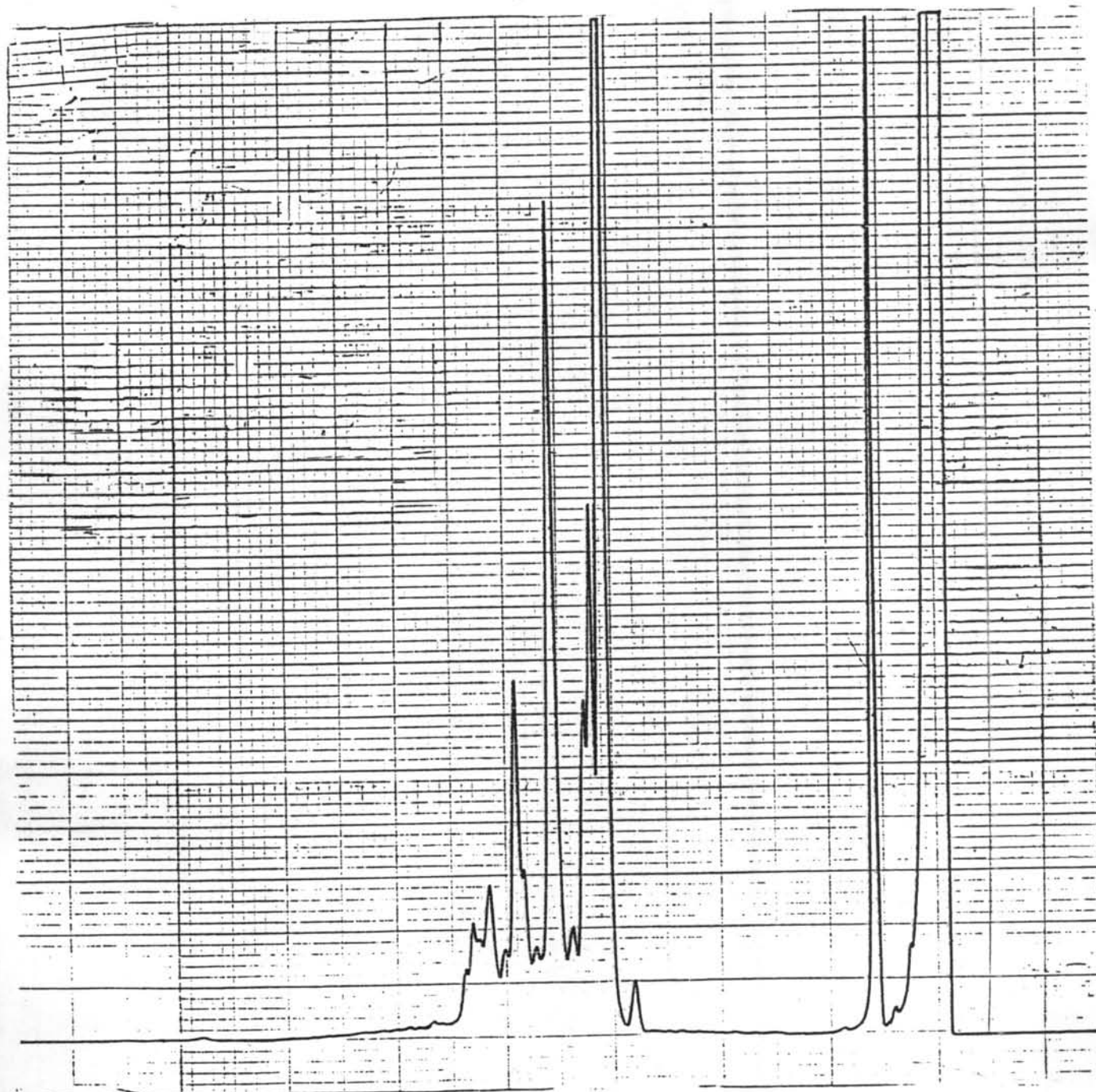
รูปที่ 1 G.C. ของ total extract ของน้ำขมิ้นใบฝรั่ง



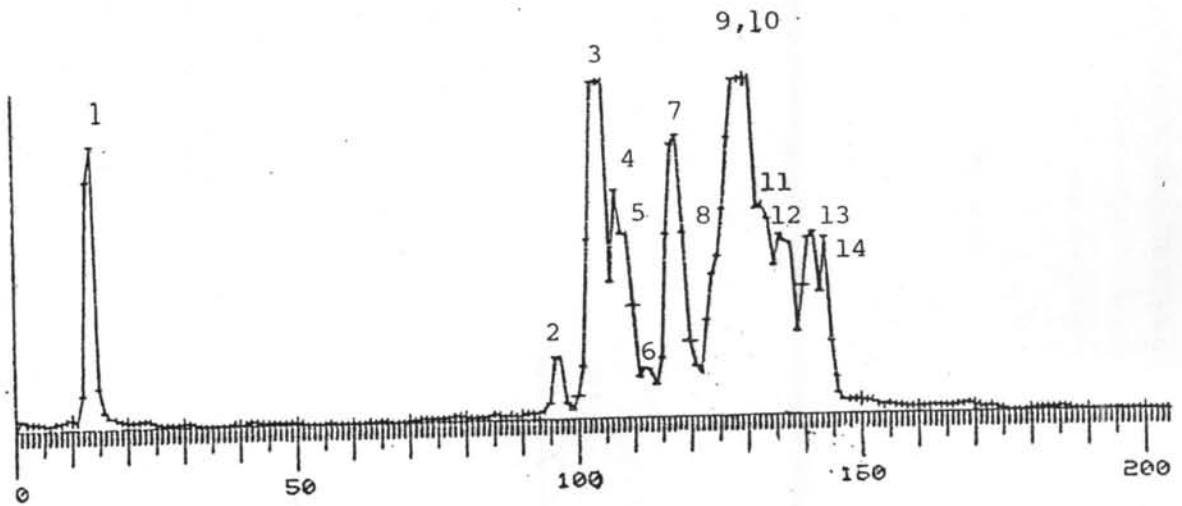
รูปที่ 2 G.C. ของ fraction ที่ I ของน้ำมันใบฝรั่ง



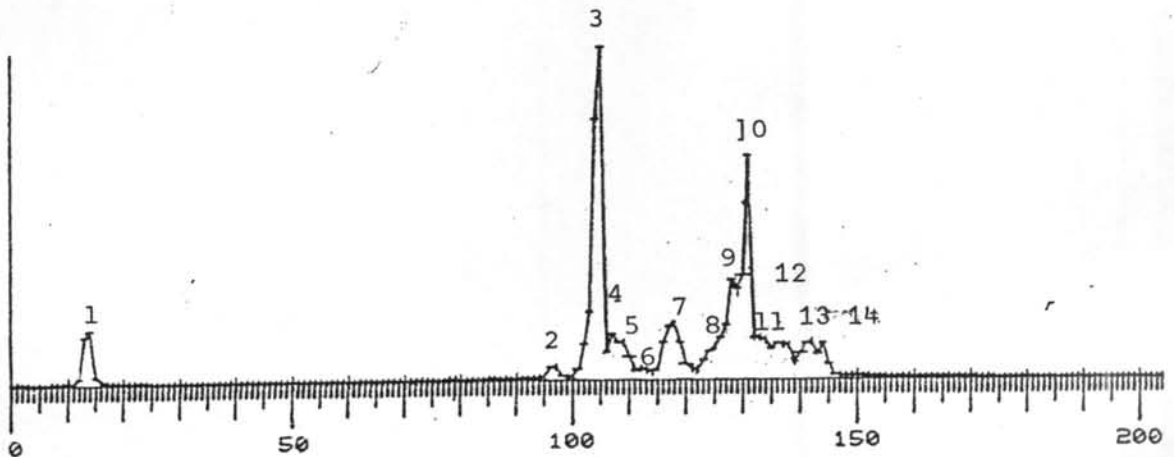
รูปที่ 3 G.C. ของ fraction ที่ II ของน้ำมันใบฝรั่ง



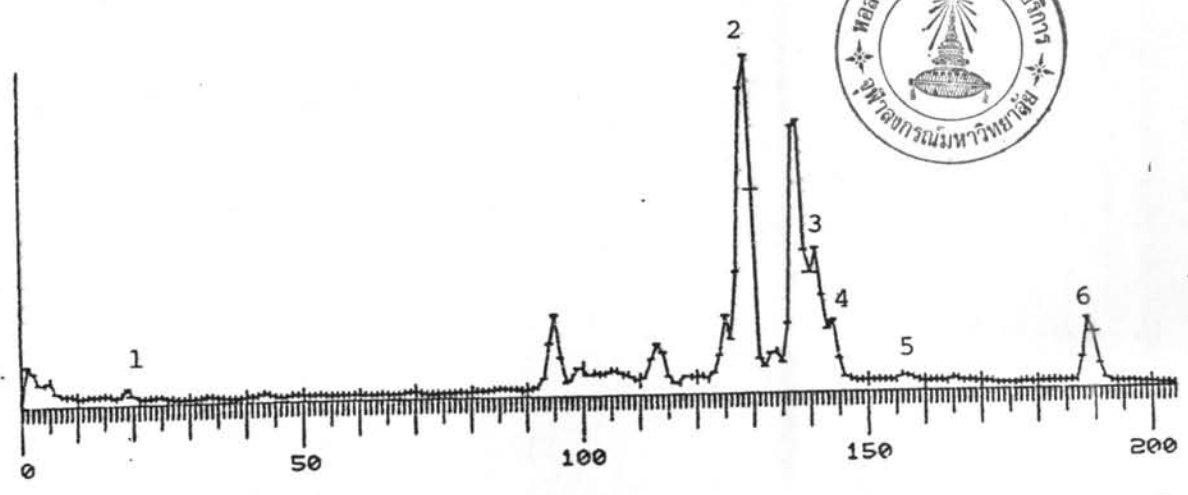
รูปที่ 4 G.C. ของ fraction ที่ III ของน้ำมันใบฝรั่ง



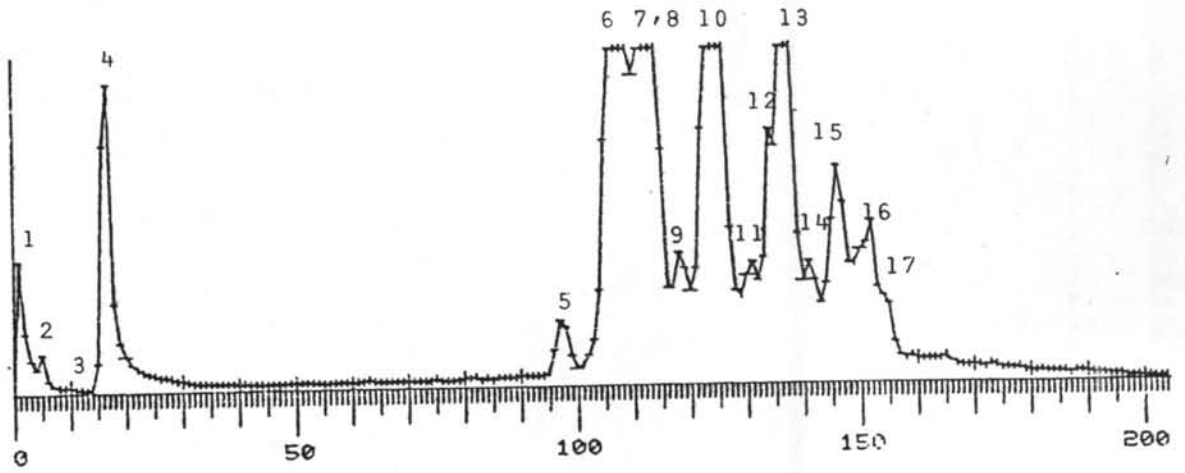
รูปที่ 5 G.C. ที่ correspond กับ M.S. ของ fraction ที่ I ขนาด scale 20 %



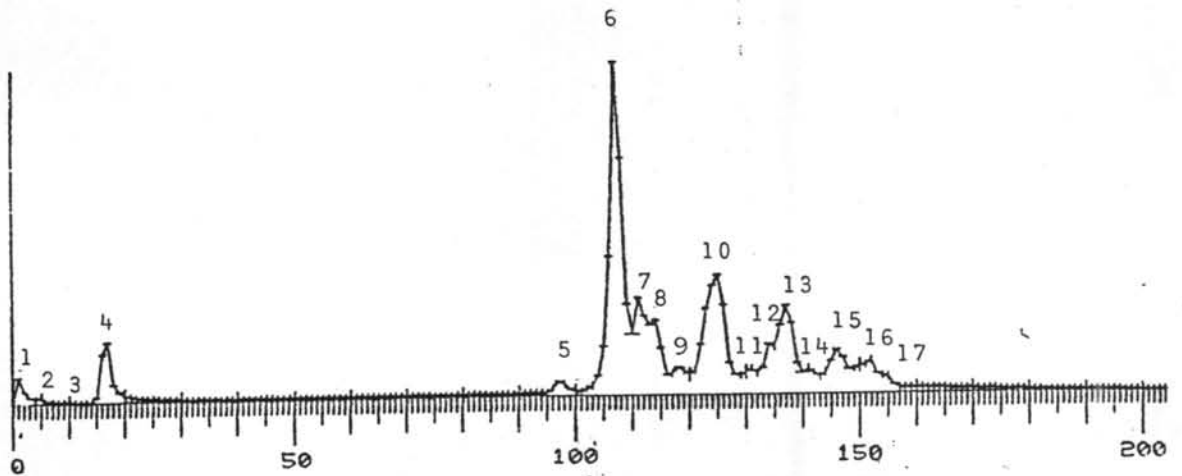
รูปที่ 6 G.C. ที่ correspond กับ M.S. ของ fraction ที่ I ขนาด scale 100 %



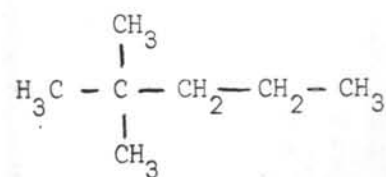
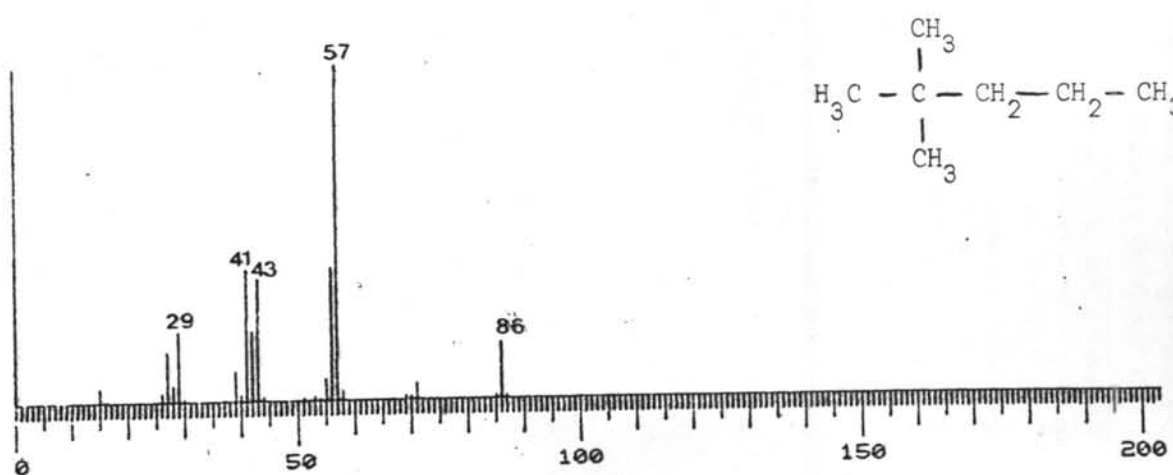
รูปที่ 7 G.C. ที่ correspond กับ M.S. ของ fraction ที่ II ขนาด scale 100 %



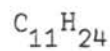
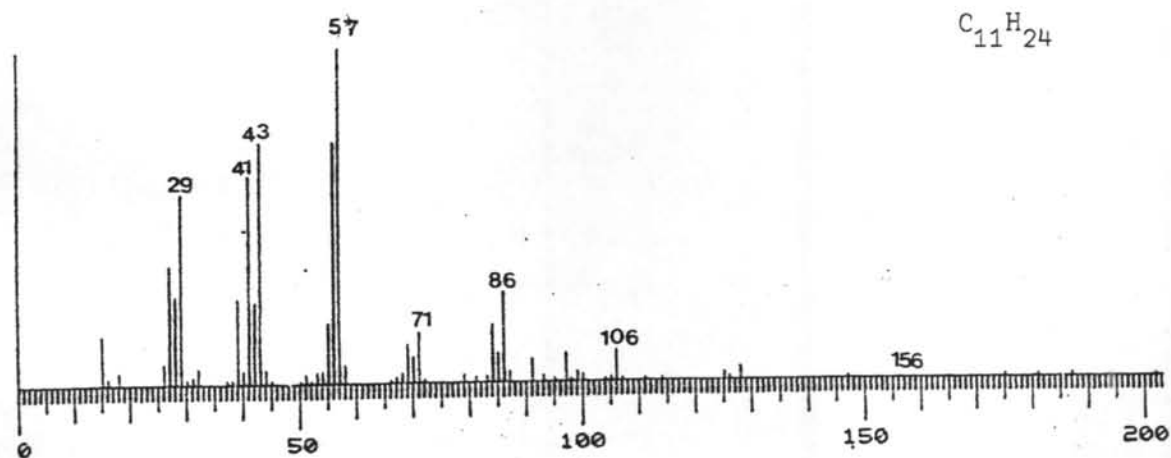
รูปที่ 8 G.C. ที่ correspond กับ M.S. ของ fraction ที่ III ขนาด scale 20 %



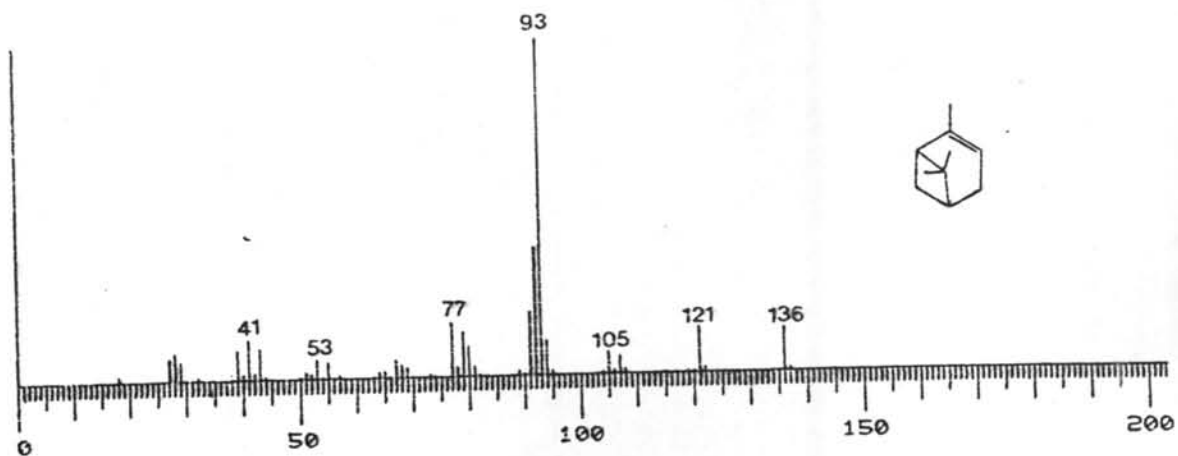
รูปที่ 9 G.C. ที่ correspond กับ M.S. ของ fraction ที่ III ขนาด scale 100 %



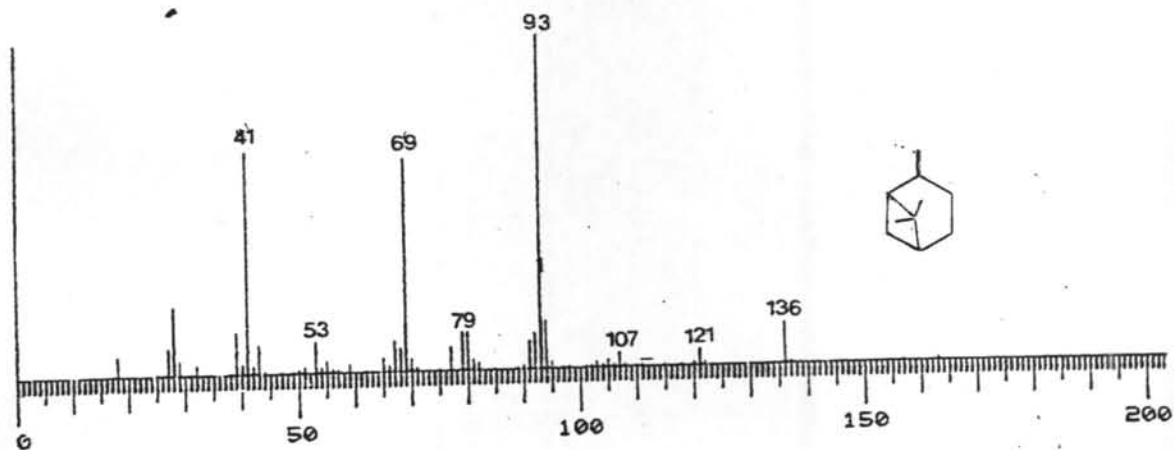
รูปที่ 10 M.S. ของ peak ที่ 1 fraction III 2,2 dimethylpentane



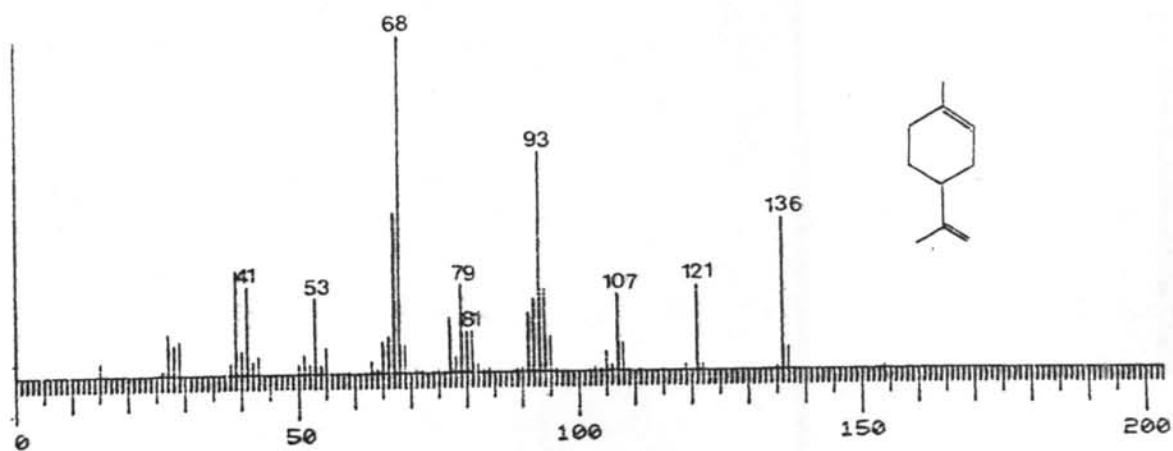
รูปที่ 11 M.S. ของ peak ที่ 1 fraction III n-undecane



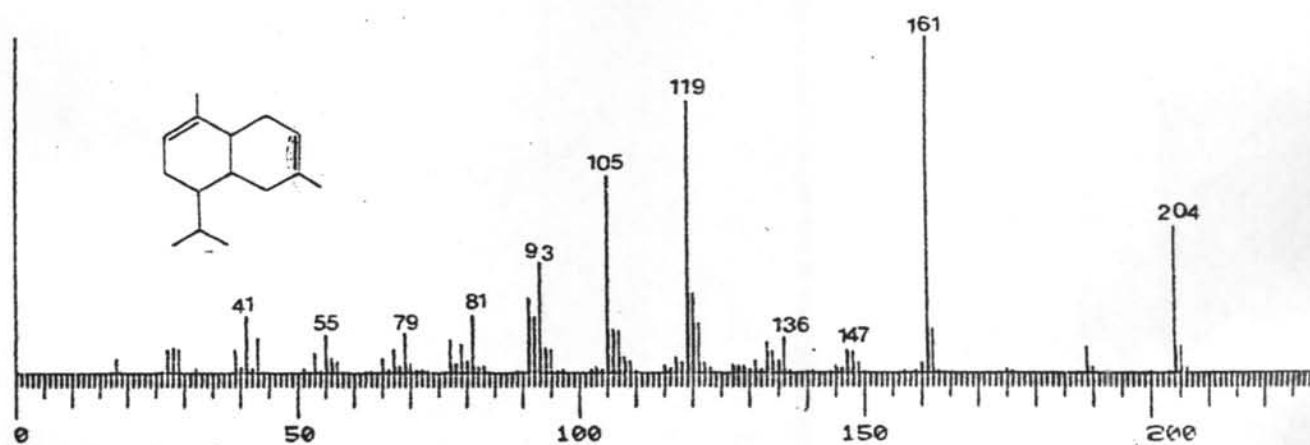
รูปที่ 12 M.S. ของ peak ที่ 1 fraction III α -pinene



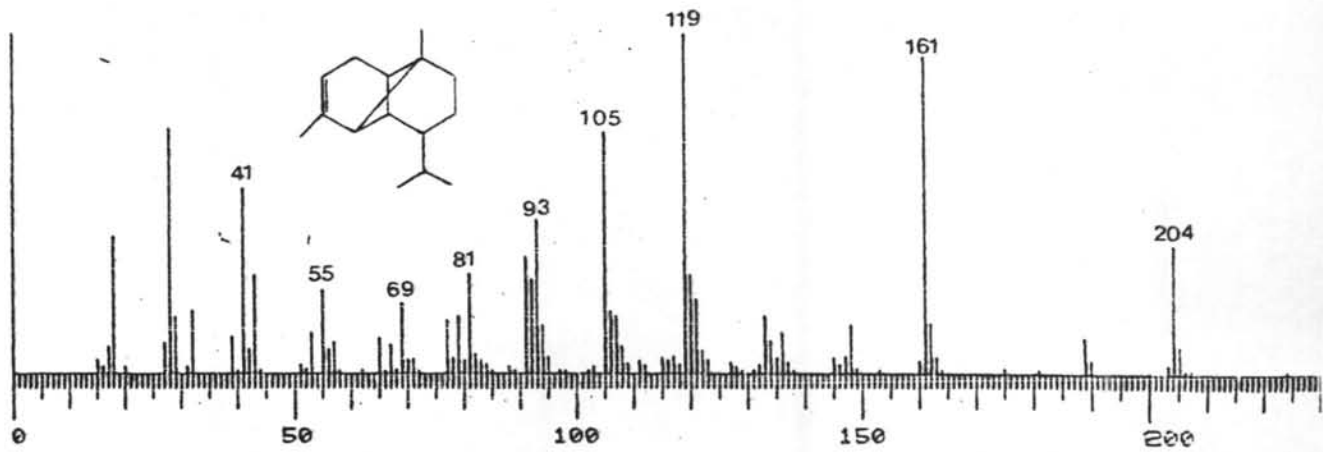
รูปที่ 13 M.S. ของ peak ที่ 3 fraction III β -pinene



រូប 14 M.S. ខ្លឹម peak 1, 4 fraction I, III Limonene



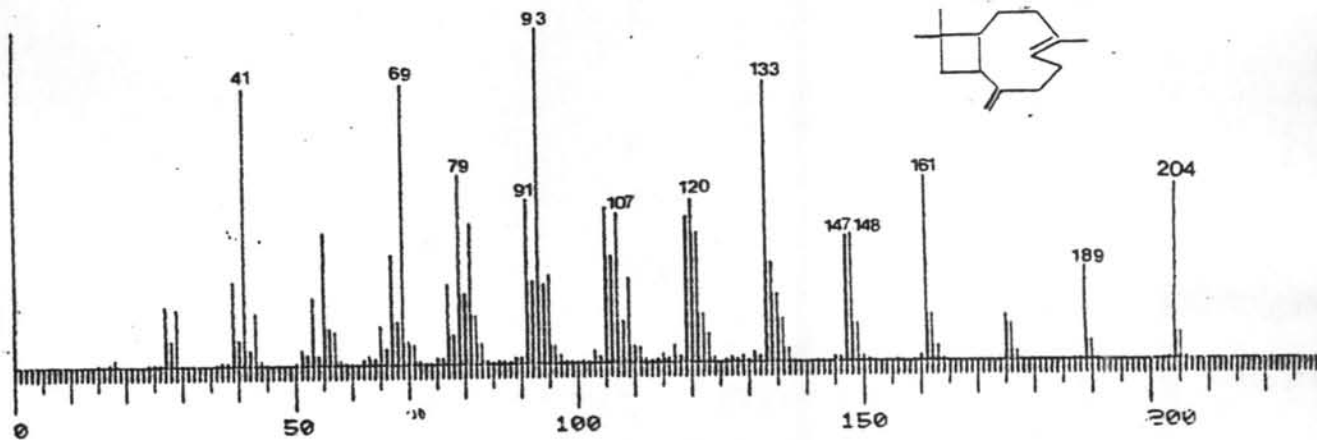
រូប 15 M.S. ខ្លឹម peak 2 fraction I Cardinene



รูปที่ 16 M.S. ของ peak ที่ 5

fraction III

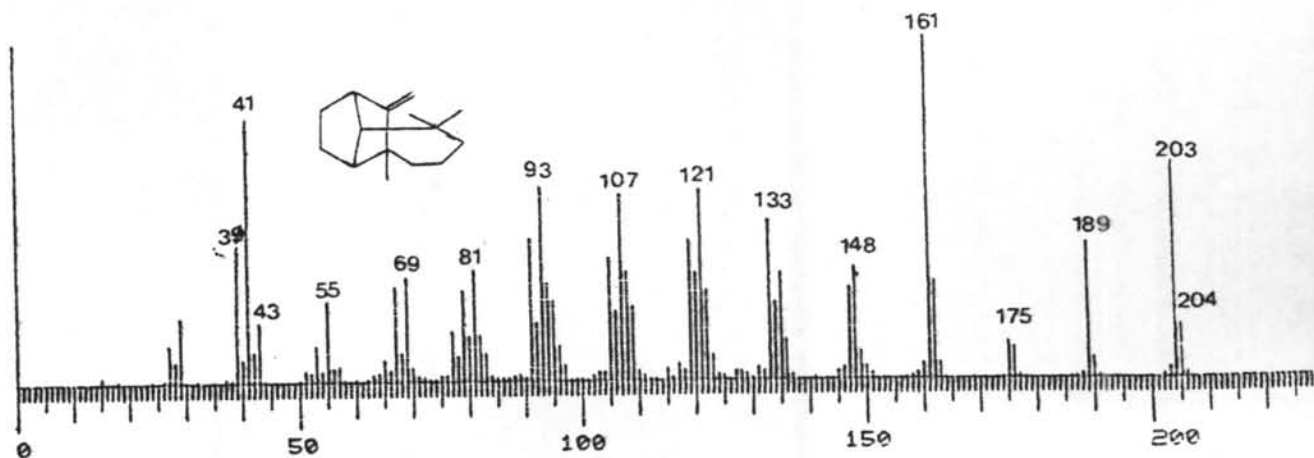
Copaene



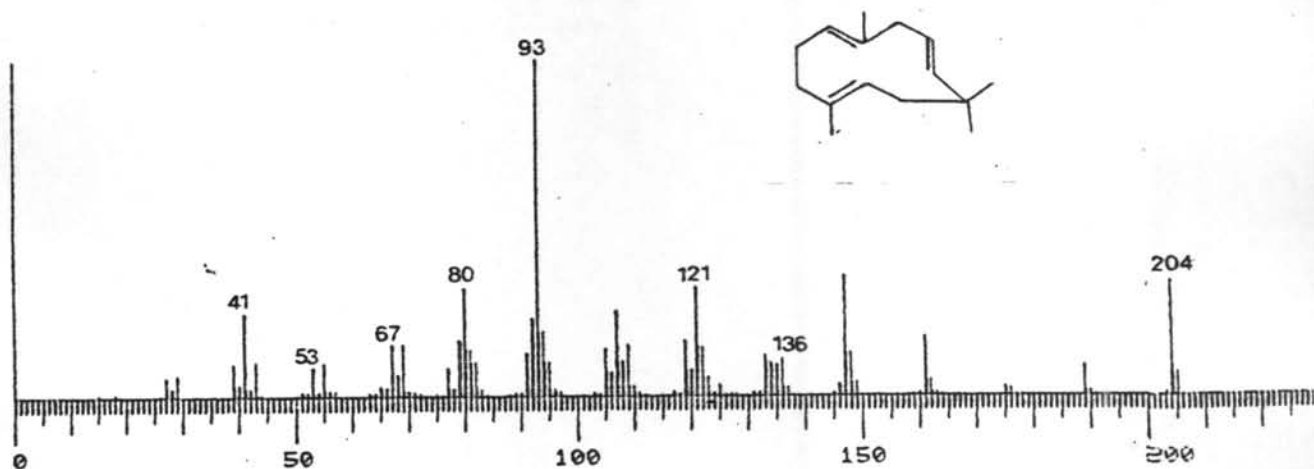
รูปที่ 17 M.S. ของ peak ที่ 3, 6

fraction I, III

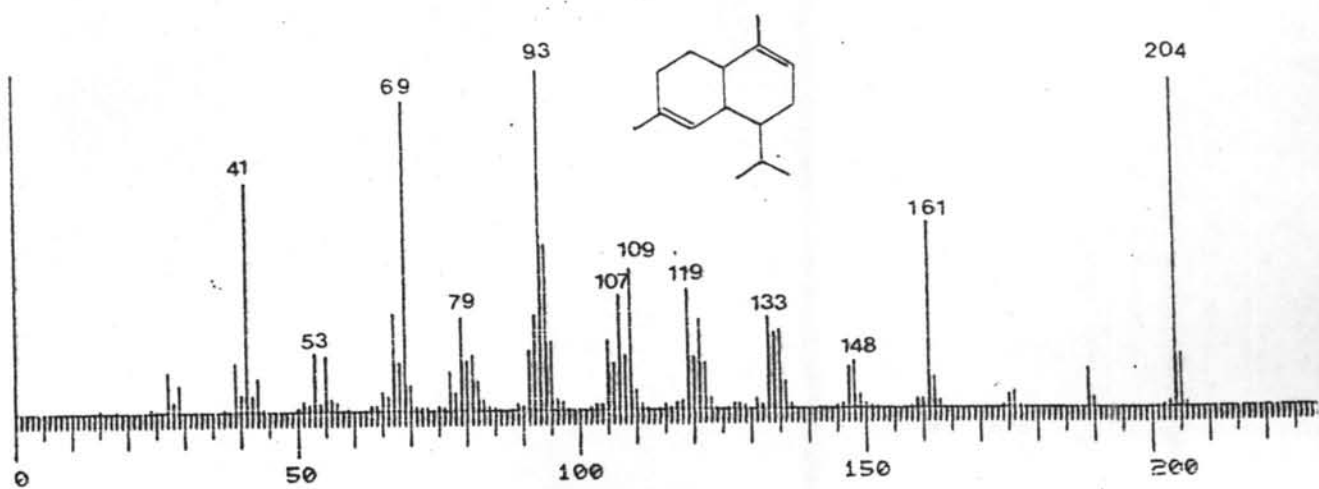
β -caryophyllene



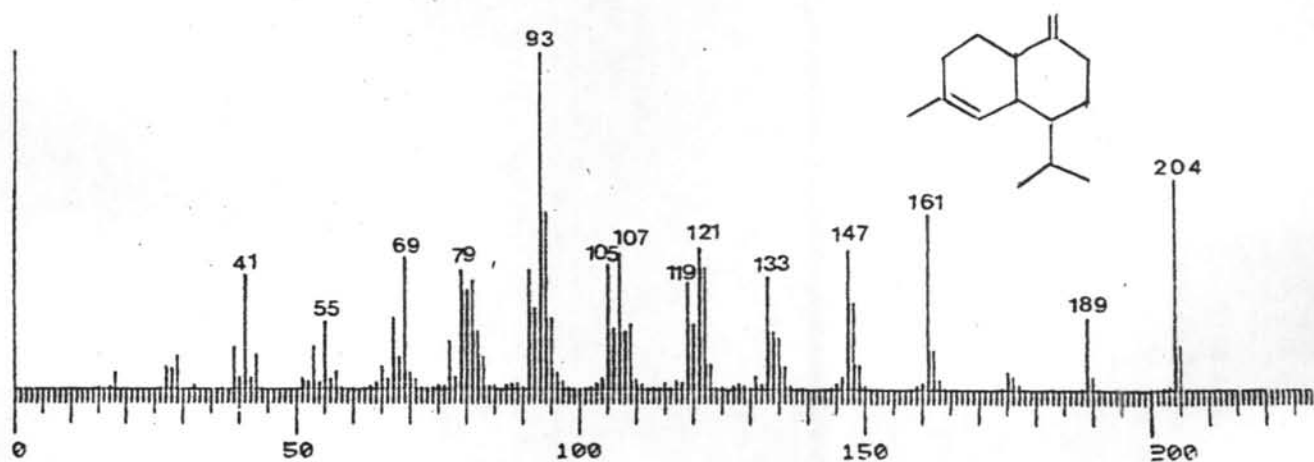
រូប 18 M.S. ចងក peak 4,7 fraction I, III Longifolene



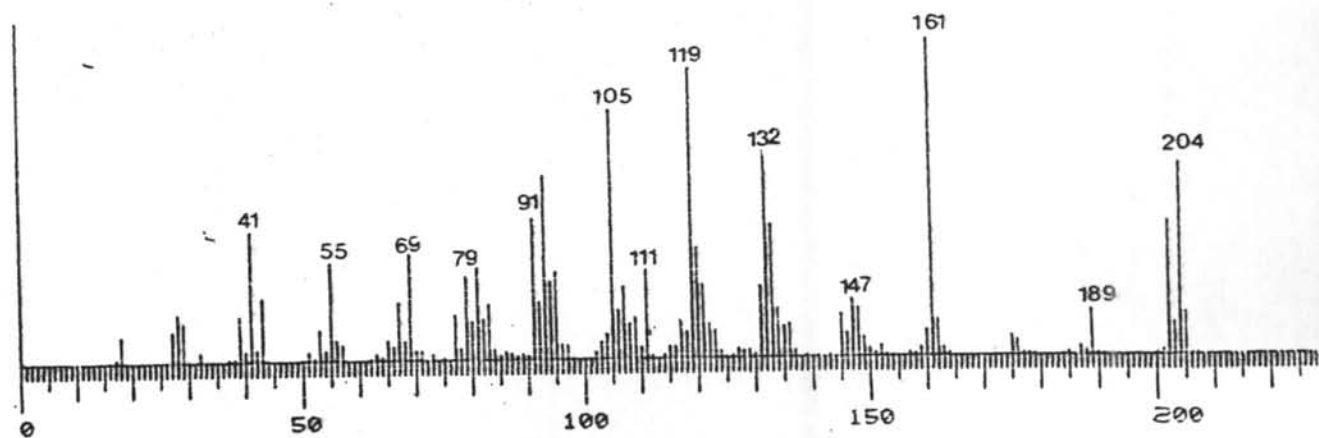
រូប 19 M.S. ចងក peak 5 fraction I α -caryophyllene



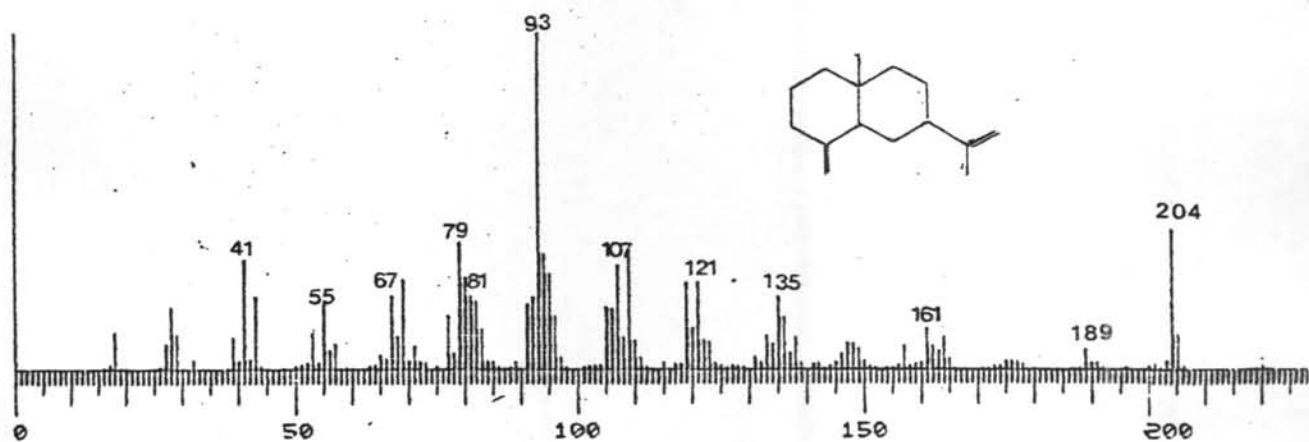
រូប 20 M.S. បង្ហាញ peak 6, 10 fraction I, III α -murolene



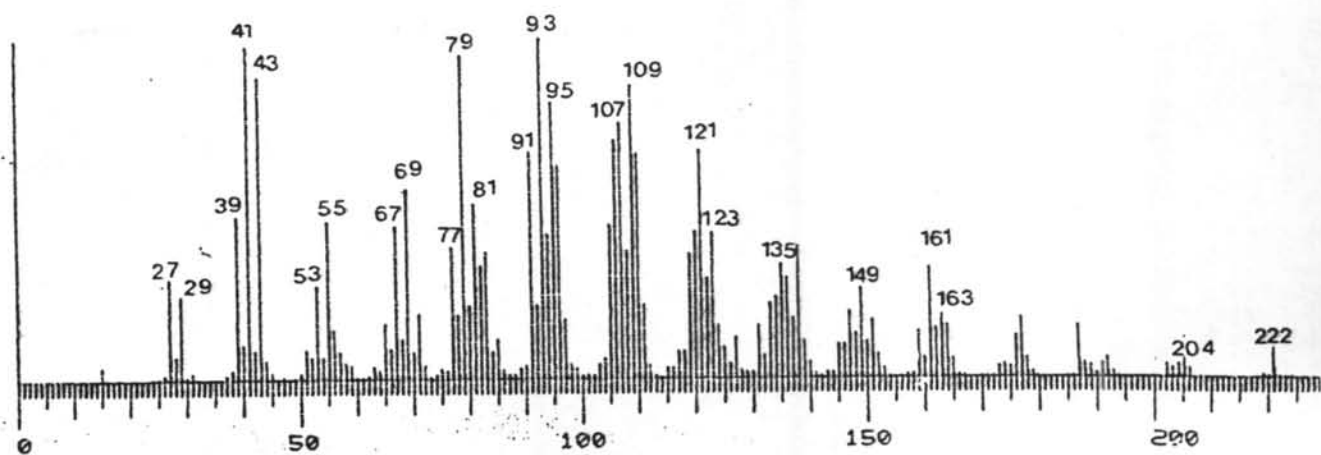
រូប 21 M.S. បង្ហាញ peak 8 fraction III γ -murolene



ပုံ ၂၂ M.S. စဉ်း peak ၉ fraction III $C_{15}H_{24}$



ပုံ ၂၃ M.S. စဉ်း peak ၁၁ fraction III β -selinene

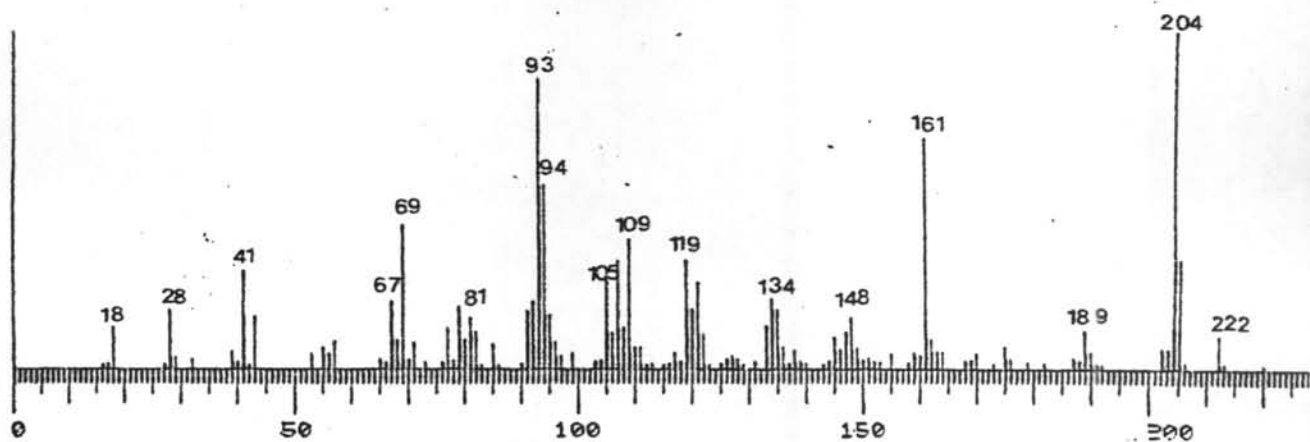


រូប 24

M.S. ឧទា peak 10

fraction I

$C_{15}H_{26}O$ (2.45 %)

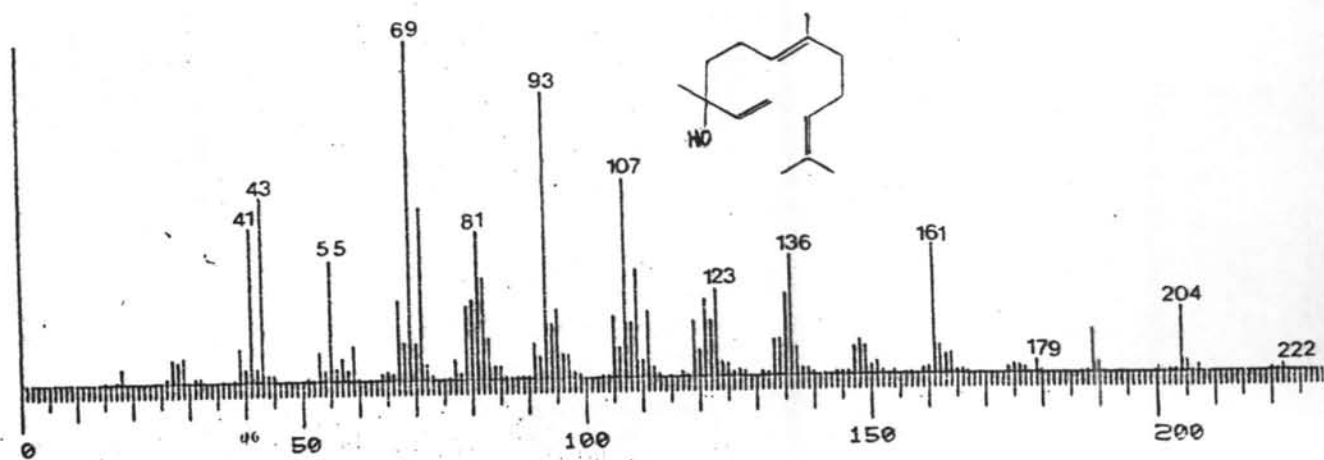


រូប 25

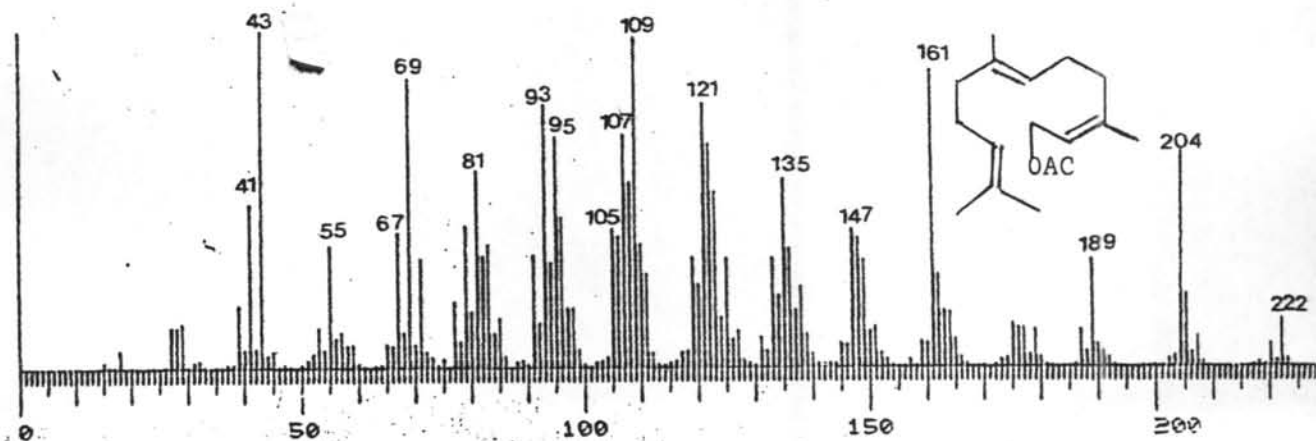
M.S. ឧទា peak 2

fraction II

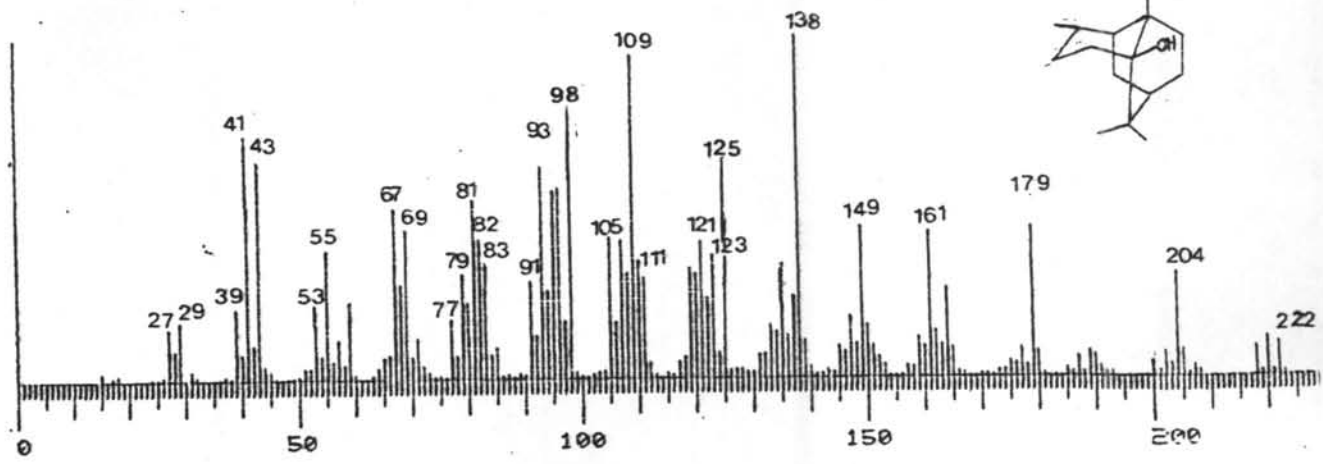
$C_{15}H_{26}O$ (8.85 %)



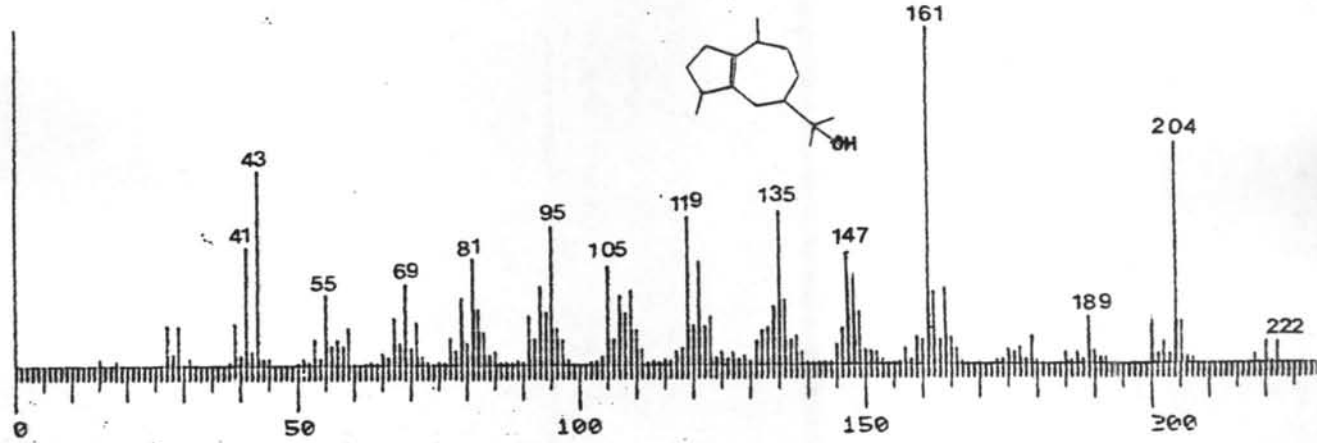
รูปที่ 26 M.S. ของ peak ที่ 8, 12 fraction I, III Nerolidol



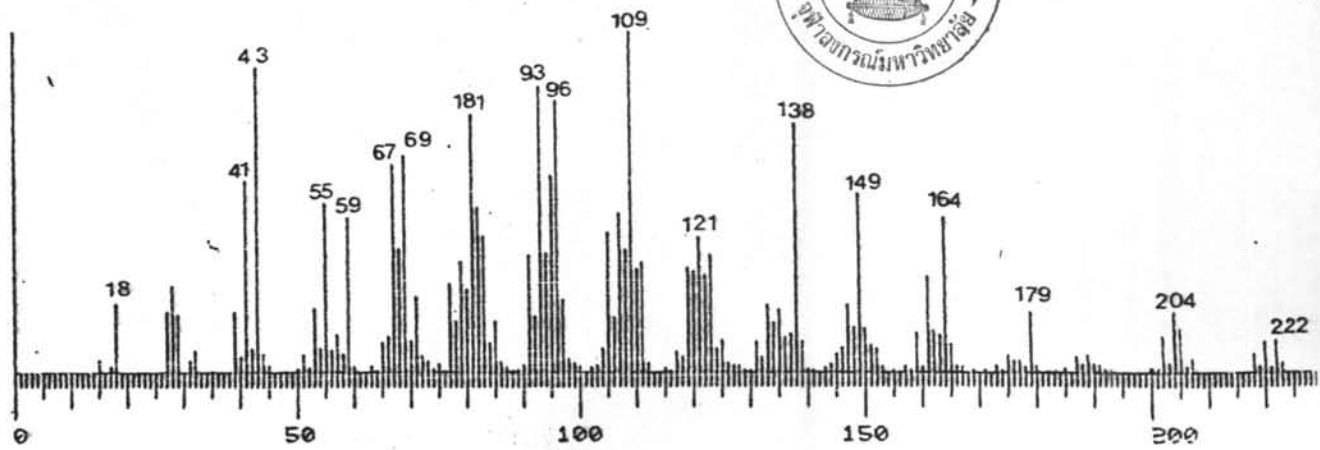
รูปที่ 27 M.S. ของ peak ที่ 13 fraction III (Farnesyl acetate)



រូប 28 M.S. បង្ហាញ peak 11 fraction I Patchouli alcohol



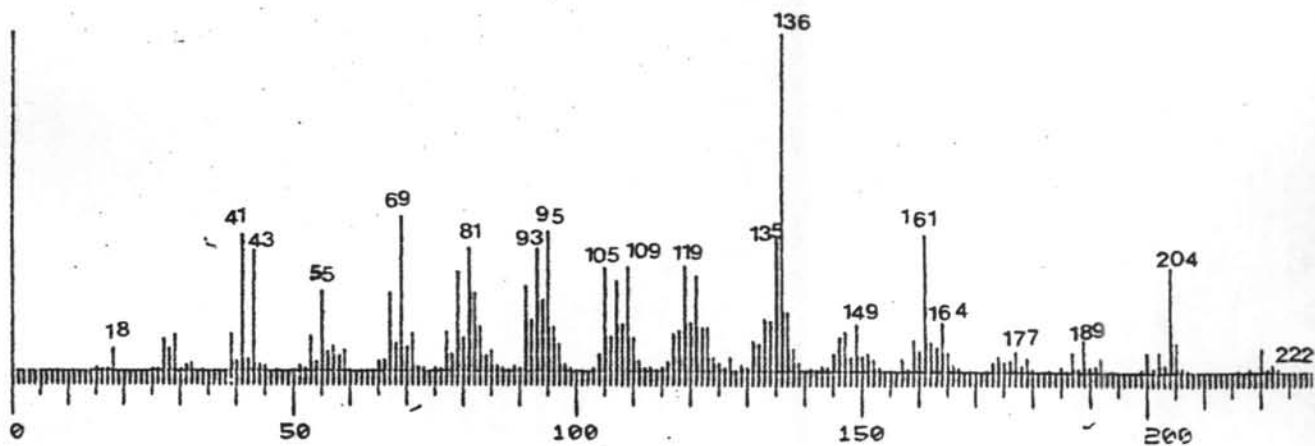
រូប 29 M.S. បង្ហាញ peak 12 fraction I Guaiol



รูปที่ 30

M.S. ของ peak ที่ 14

fraction III

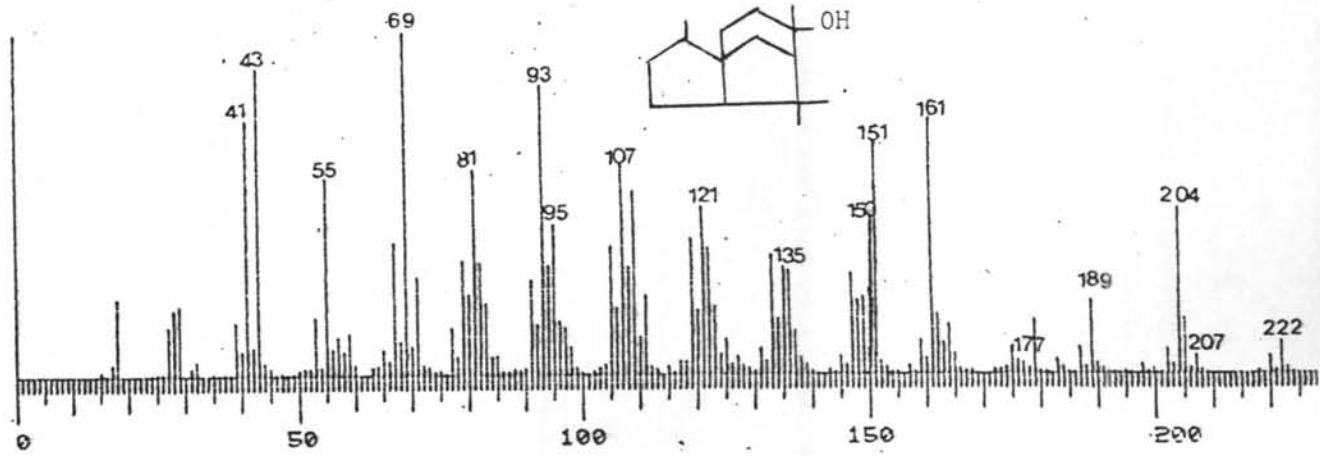
 $C_{15}H_{26}O$ (0.77 %)

รูปที่ 31

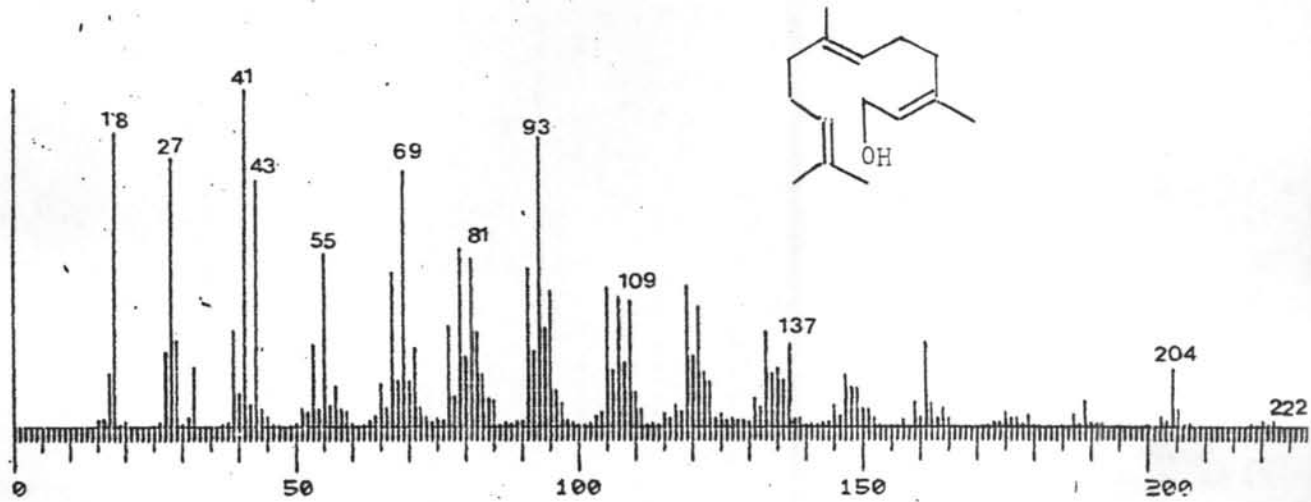
M.S. ของ peak ที่ 15

fraction III

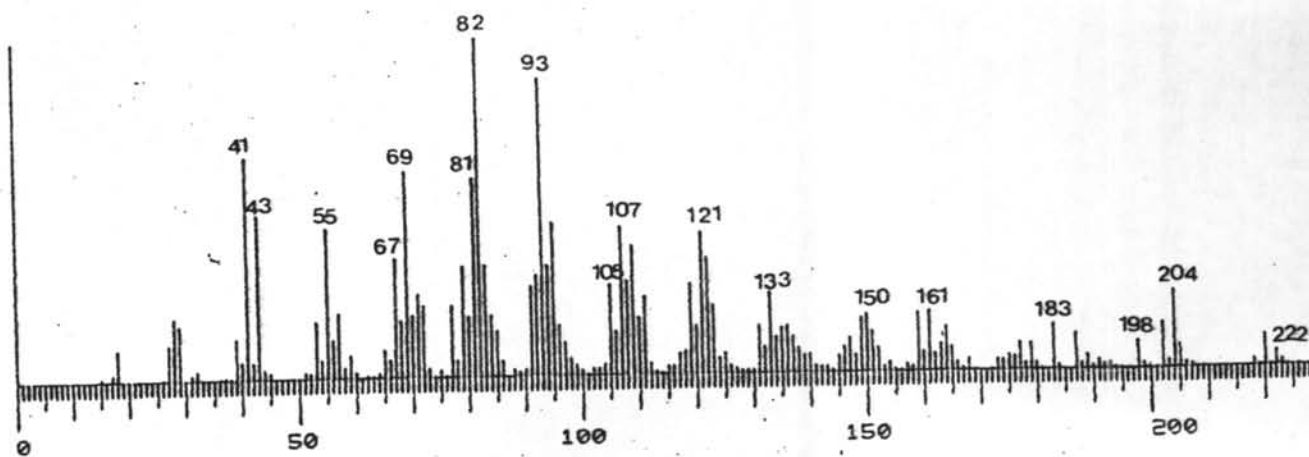
 $C_{15}H_{26}O$ (2.42 %)



រូប 32 M.S. បង្ហាញ peak 41, 3 រវាង 4,17 fraction I, II, III Cedrol



រូប 33 M.S. បង្ហាញ peak 41 5 fraction II Farnesol

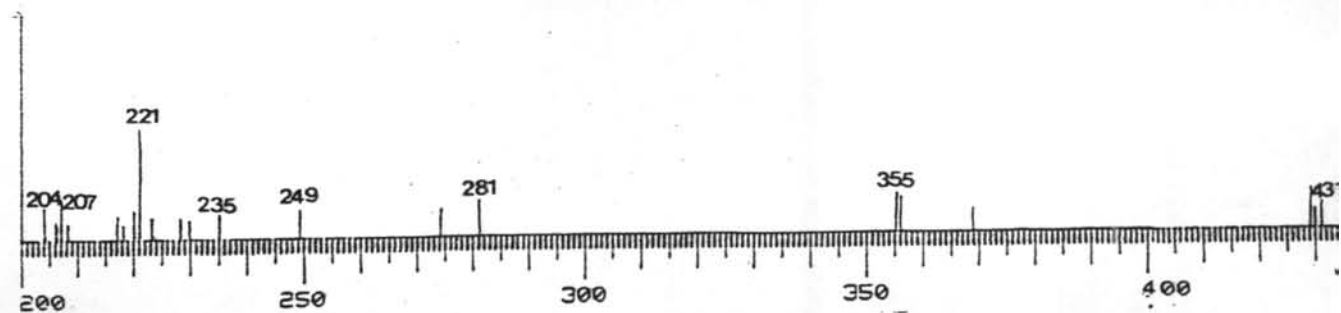
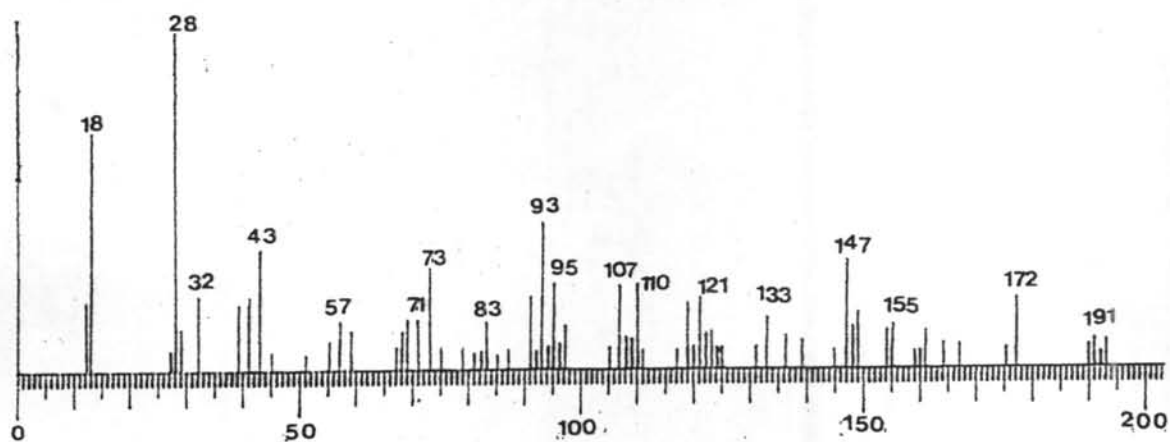


ပုံ 34

M.S. စဉ် peak 16

fraction III

$C_{15}H_{26}O$ (1.58 %)



ပုံ 35

M.S. စဉ် peak 6

fraction II

Miscellaneous

ภาคผนวก

สำรปญ



หน้า

รายการตารางและแผนภาพประกอบ	53
รายการภาพประกอบ	54
บทที่	
1. บทนำ	55
2. การทดลอง	57
2.1 การสกัด	57
2.2 การแยกสำร	59
2.3 การทำสำรให้บริสุทธิ์	61
2.4 การตรวจสอบลักษณะของสำรที่แยกออกมาได้	61
2.5 การเตรียมอนุพันธ์และ hydrolyse ของสำร	62,63
3. สรุปลและวิจารณ์ผลการทดลอง	65

รายการตารางและแผนภาพประกอบ

	หน้า
แผนภาพแสดงวิธีการสกัดของต้นเหงือกปลาหมอ	58
ตารางแสดงผลการทดสอบ antineoplastic activity ของต้นเหงือกปลาหมอ	59
ตารางที่ 1 แสดงผลของการแยก crude ที่ได้จากการสกัดในชั้น chloroform โดย column chromatography	60

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. IR spectrum ของสาร c (decomposition point 292 ^o c)	72
2. IR spectrum ของ acetate ของสารc (mp. 162 - 3 ^o c).....	72
3. ¹ H NMR spectrum ของสารc	73
4. ¹ H NMR spectrum ของ acetate ของสารc	73
5. ¹³ C NMR proton decoupled spectrum ของสารc	74
6. ¹³ C NMR proton decoupled spectrum ของ acetate ของสาร c	75
7. Mass spectrum ของสารc	76
8. Mass spectrum ของ acetate ของสาร c	76
9. IR spectrum ของβ - sitosterol	77

บทที่ 1

บทนำ



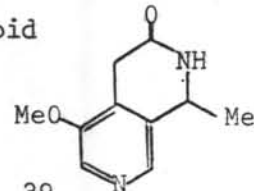
ต้นเหงือกปลาหมอ เป็นพืชในตระกูล Acanthaceae⁵ มีถิ่นอยู่ทั่วไปแถบบริเวณเมดิเตอร์เรเนียน, แอฟริกา, แถบตะวันออกของเอเชียและมาเลเซีย ที่พบตามต่างๆ มีถึง 14 species แต่ที่พบในประเทศไทยมีเพียง 2 species คือ Acanthus ilicifolius และ Acanthus ebracteatus.

เหงือกปลาหมอเป็นต้นไม้จำพวกไม้พุ่มเป็นไม้กึ่งร่ม มีใบเขียวชะอุ่มตลอดปี ลำต้นเกลี้ยงสูงราว 1-5 ฟุต ใบยาวประมาณ 6 นิ้ว รูปใบยาว ขอบใบจัก สักขณะใบเป็นมัน เหนียวมีหนามแข็ง ก้านใบอาจมีหนาม หรือบางทีก็ไม่มี ดอกเป็นช่อติดไม้ก้าน ออกที่ยอด แต่ละดอกมีกลีบรองดอกอยู่ 2 คู่ กลีบดอกมีขน ดอกยาว $1\frac{1}{4}$ นิ้ว ดอกมีทั้งสีม่วงและสีขาว ผลยาวประมาณ $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{3}$ นิ้ว ชอบขึ้นตามริมแม่น้ำคูคลองที่น้ำไหลขึ้นลงได้ และชายเลนที่น้ำลึกตื้นสลับเค็ม โดยทั่วไปเรียกว่าต้นเหงือกปลาหมอ หรือต้นแก้มหมอ

สรรพคุณทางยาของต้นเหงือกปลาหมอ แพทย์แผนโบราณในประเทศไทย³ เชื่อว่า ไข่ทั้งต้นและรากต้มอาบภายนอกแก้พิษไข้ ผื่นคัน แก้โรคผิวหนังทุกชนิด ต้นสดตำละเอียดใช้พอกปิดฝีหรือแผลเรื้อรังถอนพิษ รับประทานภายในเป็นยาแก้ฝีดาษและฝีทั้งปวง ผลของเหงือกปลาหมอรับประทานเป็นยาขับโลหิตระดูได้ดี ส่วนในประเทศฟิลิปปินส์³⁴ ใช้ส่วนใบและรากเป็นยาต้มแก้โรคหืด ยาบำรุงประสาท ยาสมุนไพร โดยเฉพาะในรากใช้บำรุงหัวใจ อัมพาต หืด ส่วนในประเทศอินเดียใช้ใบแก้โรคปวด ไขข้ออักเสบมาก ๆ ไข้แก้โรคไขข้อ (Rheumatism) และปวดศีรษะ

เนื่องจากต้นเหงือกปลาหมอเป็นที่เชื่อถือกันว่ามีคุณประโยชน์ทางยาและมีคนใช้กันมากในปัจจุบัน แต่จากการค้นเอกสารอ้างอิงพบว่าจะยังไม่มีการศึกษาคุณค่าทางยาและส่วนประกอบทางเคมี จนในปี 1977 นายอนันต์ ตั้งทองคำ³⁵ ได้ทำการสกัดสารเคมีจากต้นเหงือกปลาหมอตามวิธีของ Wall ส่วนที่สกัดด้วยอีเทอร์ละลายอีเทอร์พบซีดีง น้ำมัน Myricyl alcohol และ Stigmasterol ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform) พบว่ามีสารจุดหลอมเหลว 292°C (decompose) ส่วนที่ละลายใน เมทานอล (methanol) พบว่ามี monosaccharide ของ glucose และ

galactose ส่วนที่ละลายในน้ำ พบเกลือคลอไรด์หลายชนิดที่มากที่สุดได้แก่เกลือคลอไรด์ของโลหะโซเดียม Bhosle, N.B และคณะ³⁶ ในปีเดียวกันนี้ได้ทำการวิเคราะห์ ส่วนใบของเหงือกปลาหมอ พบว่าในใบมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต, ไขมันและโปรตีนสูงมาก ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้เป็นอาหารของสัตว์ ต่อมา Bhosale, Lee J.³⁷ (1979) ได้ทำการวิเคราะห์พวก trace element ในใบเหงือกปลาหมอ พบว่ามี Mo และ Zn ประมาณ 16.7 และ 24.7 $\mu\text{g/g}$ ของใบเหงือกปลาหมอ แห่ง ตามลำดับ Tiwari, K.P. และคณะ³⁸ (1981) ได้ทำการแยก อัลคาลอยด์ใหม่(new alkaloid) จากเหงือกปลาหมอโดยโครงสร้างของสารได้จากการเปรียบเทียบกับ spectral กับ Jasminidine และ jasmnine โดยให้ชื่อว่า Acanthicifoline alkaloid



ต่อมาในปีเดียวกันนี้ พวกเขาได้ทำการสกัดในเหงือกปลาหมอ³⁹ พบ olenolic acid, β -sitosterol, Lupeol, Quercetin, Quercetin glycoside และ Frigonellin ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยต่อจากนายอนันต์ ตั้งทองคำ เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารในส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform) และนำสารที่สกัดได้แต่ละ fraction ไปทดสอบ antineoplastic activity เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป

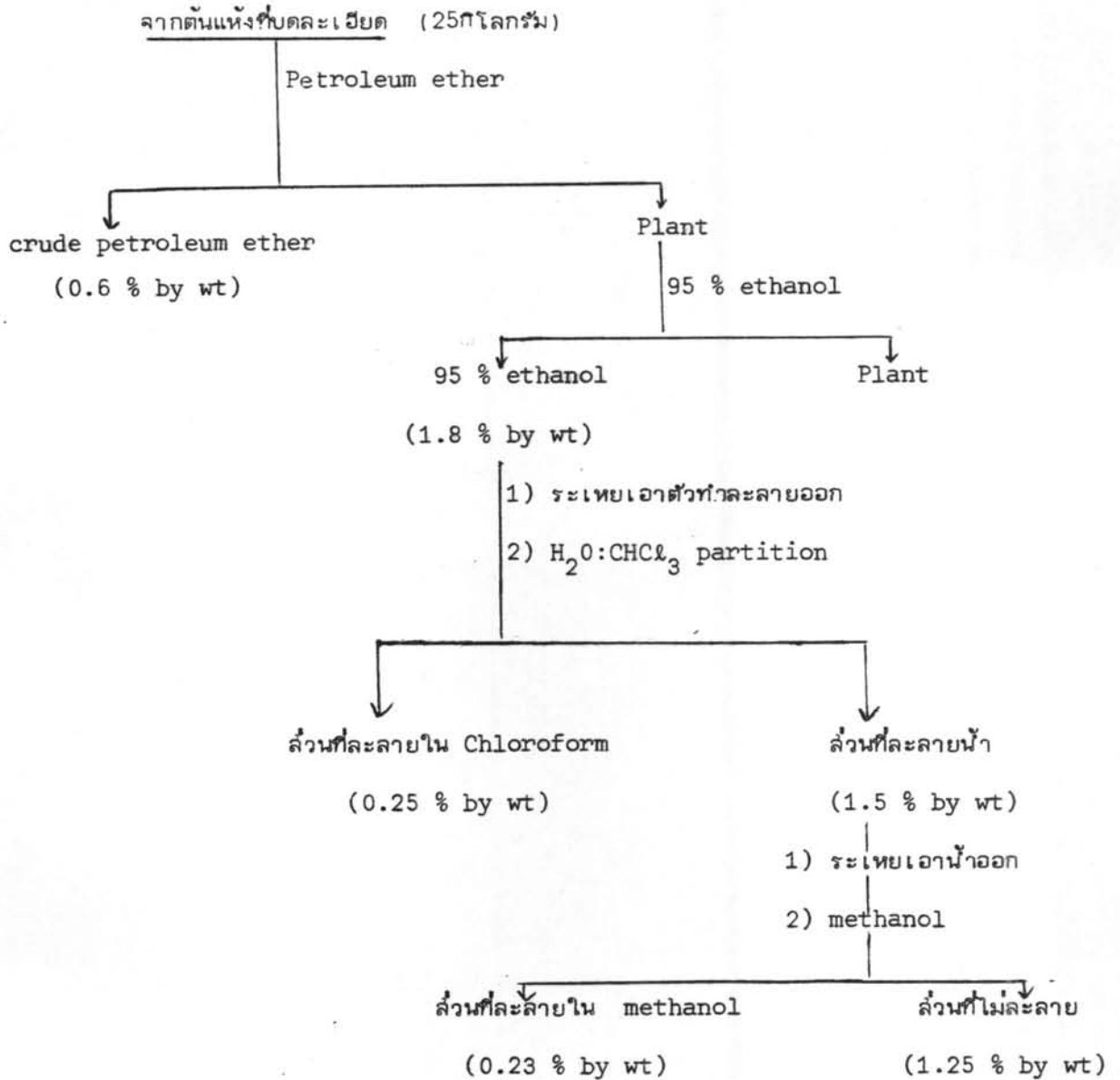
บทที่ 2

2.1 การทดลอง

2.1.1 การสกัด (Extraction)

นำต้นเหงือกปลาหมอแห้งที่บดละเอียด 25 กิโลกรัม มาสกัดด้วย petroleum ether โดยวิธีแช่สารไว้ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาครั้งละ 7 วัน ทำซ้ำทุก 8 ครั้ง เพื่อเอาสารที่ละลายในตัวทำละลายชนิดนี้ออกไปให้หมดก่อนได้ crude ที่ละลายใน petroleum ether หนัก 148 กรัม แล้วนำไปแช่ต่อด้วย 95% ethanol ครั้งละ 7 วัน ทำซ้ำ ๆ กัน 3 ครั้ง กรองเอาสารที่สกัดได้แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกไปจนเหลือปริมาตร 150-200 cm³ เทสารละลายที่เหลือลงใน beaker ตั้งทิ้งไว้โดยใช้พัดลมเป่าจนแห้งผลที่ลู่ได้สารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวมืดน้ำหนัก 460 กรัม นำเอา crude ที่ได้ไปละลายใน chloroform และส่วนที่ไม่ละลายใน chloroform นำมาละลายต่อในน้ำ จากนั้นเข้าเครื่อง liquid-liquid extractor โดยใช้ chloroform และน้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาสกัดครั้งละ 6 ชั่วโมง แยกออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่ละลายในชั้นน้ำ และส่วนและส่วนที่ละลายในชั้น chloroform ระเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารที่ละลายในชั้นของ chloroform มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวย้ำเข้มและเหนียว หนัก 62 กรัม ส่วนสารที่ละลายในชั้นน้ำ จะมีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลอมแดงหนัก 370 กรัม จากส่วนที่ละลายในชั้นน้ำนำมาละลายใน methanol แยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่ละลายใน methanol เป็นพวกเกลืออินทรีย์ หนัก 310 กรัม ส่วนที่ละลายเป็นพวก monosacchoride หนัก 57 กรัม

แผนภาพแสดงวิธีการสกัดของต้นเหงือกปลาหมอ



จากนั้นนำ crude ที่ได้ในแต่ละตัวที่ละลายที่ไข้สกัดไปทดสอบ antineoplastic activity
มีผลดังนี้

.Cell Culture Screen for antineoplastic activity* ของต้นเหงือกปลาหมอ

Solvent	E.D. 50**($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Activity
95 % ethanol	>> 500	inactive
petroleum ether	> 100	inactive
H ₂ O	> 1000	inactive
chloroform	140	inactive

* ทำการทดสอบโดย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย

** ED 50 = Medium Effective dose (The dose that inhibits growth to 50 % of control growth)

If. ED. 50 > 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, the sample is inactive.

2.2. การแยกสาร (Separation)

ละลาย crude ในชั้นของ chloroform ที่ได้จาก 2.1.1 (15 กรัม) ใน chloroform (50 cm^3) ผ่านสารละลายลงในใน column chromatography ซึ่งมี Aluminiumoxid 90 Art.1097 ของบริษัท Merck (300 กรัม) เป็น adsorbent แล้ว elute column โดยใช้ solvent system ดังนี้ chloroform-petroleum ether ชนิด 2:3 และ 3:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ chloroform, methanol-chloroform ชนิด 1:19 1:9 1:4 และ 1:1 โดยปริมาตรตามลำดับ และ methanol โดยเก็บ eluent ครั้งละ 500 cm^3 นำแต่ละ fraction ที่ได้ไปกลั่นไล่ตัวทำละลายออกจนเหลือสารในขวดกลั่นประมาณ 15-20 cm^3 ถ่ายใส่ขวดรูปกรวยขนาด 50 cm^3 แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก รวม fraction ย่อยต่าง ๆ เป็นพวก ๆ โดยการทดสอบด้วย T.L.C.

.ตารางที่ 1 แสดงผลของการแยก crude ที่ได้จากการสกัดในชั้น chloroform โดย column chromatography

Eluent	Eluent fraction	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว
chloroform-petroleum ether 2:3 โดยปริมาตร	1-8	น้ำมันสีเหลือง
chloroform-petroleum ether 3:1	9-18	น้ำมันสีเขียว
chloroform	19-27	น้ำมันสีน้ำตาล
methanol-chloroform 1:19 โดยปริมาตร	28-34	น้ำมันสีน้ำตาล
methanol-chloroform 1:9 โดยปริมาตร	35-40	น้ำมันสีน้ำตาล
methanol-chloroform 1:4 โดยปริมาตร	41-43 44-58	น้ำมันสีน้ำตาล สารมีลักษณะ amorphous ไม่มีสี m.p. 292 ^o c (decompose)
methanol-chloroform 1:1 โดยปริมาตร	59-63	น้ำมันสีดำ
methanol	64-70	น้ำมันสีดำ

2.3 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

สารที่แยกได้จาก column chromatography โดยเริ่มจาก crude ที่ละลายใน chloroform จำนวน 15 กรัม ใน fraction ที่ 44-58 โดยการใช้น้ำละลายผลระหว่าง methanol : chloroform (1:4 โดยปริมาตร) เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมาเป็น amorphous หนัก 60 มิลลิกรัม จากการทดสอบด้วย T.L.C พบว่ามีน้ำมันเข็มน ซึ่งนำมาทำ ให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกผลึกหลายครั้งในสภาวะละลายผลระหว่าง methanol : chloroform (1:3 โดยปริมาตร) และทดสอบด้วย T.L.C จนไม่มีสารอื่น ๆ เข็มนได้สารมีลักษณะเป็น amorphous มี decomposition point ที่ 292°C

2.4 การตรวจสอบลักษณะของสารที่แยกออกมาได้

2.4.1 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพและ colour reaction ของสาร c

สาร c (decomposition point 292°C) ละลายได้ใน ethanol ร้อนปริมาณ มาก ๆ และสารละลายผลระหว่าง methanol กับ chloroform สาร c ให้สีม่วงแดงกับ Liebermann Burchard reagent จาก thin layer chromatography โดยใช้ silica gel เป็น absorbent มี methanol : chloroform อัตราส่วน 1 : 4 โดยปริมาตรเป็น developing agent จะมีค่า $R_f = 0.66$

ผลการวิเคราะห์ธาตุ	ครั้งที่ 1 พบ	C = 72.26 %	H = 10.22 %
	ครั้งที่ 2 พบ	C = 72.89 %	H = 10.32 %

IR spectrum ใน ν_{max} KBr (cm^{-1}) แสดง broad absorption band ที่ $3470 - 3220 \text{ cm}^{-1}$ และ $1150 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ sharp absorption band ที่ช่วง 2900 และ 2800 cm^{-1} ส่วน medium absorption band จะเห็นที่ช่วง 1460 และ 1370 cm^{-1} ตามรูปที่ 1 หน้า 72

^1H NMR spectrum δ (DMSO-d_6 : CDCl_3) แสดง broad multiplet ซึ่งมีลักษณะ

complex ที่ช่วง δ 0.67 - 2.17 และ multiplet peak ที่ช่วง 5.08 - 5.5 ,
 3.50 - 3.83, 4.67 - 4.92 แสดง triplet peak ที่ช่วง 4.17 - 4.50 และ
 singlet peak ที่ช่วง δ 2.10, 2.20 และ 2.30 ดังรูปที่ 3 หน้า 73 จาก mass
 spectrum แสดง m/e ที่สูงสุดเป็น 414 และ m/e อื่น ๆ ที่สำคัญดังนี้ 396, 381, 351,
 329, 303, 281, 275, 255, 213, 159, 147, 133, 121 ดังรูปที่ 5 หน้า 76
 ส่วน ^{13}C NMR ของสาร c ปรากฏดังรูปที่ 5 หน้า 74

2.5 การเตรียมอนุพันธ์ของสาร c

2.5.1 การ Acetylation ของสาร c (decomposition point 292°C)

ละลายสาร c 100 มิลลิกรัม ใน anhydrous pyridine 1 cm^3 เติม acetic
 anhydride ลงไป 1 cm^3 นำสารละลายนี้มา reflux บน water bath เขย่าเป็นเวลา
 4 ช.ม. จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเทลงในน้ำแข็ง พร้อมทั้งคนจนกระทั่ง acetic anhydride
 ที่เหลือถูก hydrolyse หมด ได้ตะกอนของ acetate ตกลงมา นำมากรองแล้วล้างด้วยน้ำ
 2 - 3 ครั้ง อบผลึกที่กรองได้ให้แห้งแล้วตกผลึกใน methanol : chloroform (3:1 โดย
 ปริมาตร) จะได้ผลึกเป็นแผ่นแวววาวไม่มีสี m.p. $162-163^{\circ}\text{C}$ ละลายได้ดีใน chloroform,
 ethyl acetate ไม่ละลายใน methanol จาก thin layer chromatography โดยใช้
 silica gel เป็น adsorbent มี chloroform เป็น developing agent มีค่า R_f 0.36
 ผลของการวิเคราะห์ธาตุ ครั้งที่ 1 พบ C 69.40 % H 9.10 %
 ครั้งที่ 2 พบ C 69.90 % H 9.13 %

*Mol wt = 670

IR spectrum ν_{KBr} (cm^{-1}) sharp absorption peak ที่ช่วง 2900, 2800
 Max

* ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีโดยส่งไปที่ Australian Micro analytical Service
 ประเทศออสเตรเลีย

และช่วง $1760 - 1730 \text{ cm}^{-1}$ medium absorption peak ที่ช่วง 1460 และ 1370 cm^{-1} ส่วน broad absorption peak ที่ช่วง $1265 - 1225$ ที่ช่วง $1075 - 1045 \text{ cm}^{-1}$ ดังรูปที่ 2 หน้า 72 $^1\text{H NMR}$ spectrum $\delta(\text{CDCl}_3)$ แสดง broad multiplet peak ที่ช่วง $0.67 - 1.80$, $5.08 - 5.5$ และ singlet peak ที่ช่วง 2.10 , 2.20 , 2.30 ตามรูปที่ 4 หน้า 73 mass spectrum แสดง m/e ที่สำคัญดังนี้ m/e 414 , 396 , 381 , 331 , 302 , 275 , 255 , 169 , 159 , 147 , 109 , 43 ตามรูปที่ 8 หน้า 77 13
C NMR ของ acetate ของสาร c ปรากฏดังรูปที่ 6 หน้า 75

2.5.2 การ hydrolyse ของสาร c

ซึ่งสาร c ประมาณ 15 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดแก๊สแล้วเติม ethanol ประมาณ 3 ช.ม.³ 2N HCl ประมาณ 0.5 cm^3 ทำการ Reflux เป็นเวลา 5 ชั่วโมงโดยเขย่าเป็นครั้งคราว ตรวจสอบปฏิกิริยาว่าเกิดลิ่มนูนแล้วหรือไม่โดยใช้ thin layer chromatography ซึ่งใช้ silica gel เป็น adsorbent chloroform เป็น developing solvent ซึ่งจะให้สีเมื่อ spray ด้วย $10\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ ระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วสกัดด้วย chloroform แยกชั้นของสารอินทรีย์ใน chloroform โดยกรองด้วยกระดาษกรอง whatman 1PS mean separators No 4015 ส่วน aqueous ยังคงอยู่บนกระดาษกรอง นำชั้นของสารละลาย chloroform มาระเหยเอาตัวทำละลายออก แล้วตกผลึกสารที่ได้ด้วย hexane ร้อน ได้สารผลึกรูปเข็ม m.p: $134 - 136^\circ \text{C}$, จาก thin layer chromatography ใช้ silica gel เป็น adsorbent, chloroform เป็น developing agent มีค่า $R_f = 0.23$

ส่วนในชั้นน้ำ นำมาทำ paper chromatography แล้ว spray ด้วย aniline hydrogen phthalate จะเห็นเป็นจุดสีส้มน้ำตาล ซึ่งเทียบกับ standard ของน้ำตาลผสมทั้ง 5 ตัว คือ glucose, galactose, xylose, rhamnose, arabinose, ปรากฏว่า solvent system ยังไม่เหมาะสมเพราะ standard ของน้ำตาลยังไม่แยกจากกัน จากนั้นนำชั้นน้ำมาทำ thin layer chromatography โดยใช้ silica gel เป็น adsorbent butanol : acetic acid : ether : น้ำ อัตราส่วน $9 : 6 : 3 : 1$ โดยปริมาตร.

เป็น developing solvent แล้ว spray ด้วย 10 % H_2SO_4 จากนั้นอบที่อุณหภูมิประมาณ
105°C ปรากฏว่าน้ำตาลที่ถูก hydrolyse ได้ค่า $R_f = 0.461$



บทที่ 3

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษานี้เพื่อต้องการทดสอบหาสารที่มีผลต่อต้าน tumour ในแต่ละ fraction เพื่อที่จะได้แยกสารออกมาและศึกษาสูตรโครงสร้างที่ได้ในลำดับแห่งอกปลาหม้อ

ในการทดสอบเบื้องต้นของต้นเหงอกปลาหม้อในด้าน antitumour activity นั้นได้ทำการทดสอบเฉพาะ antineoplastic activity ในชั้นน้ำ 95 % ethanol, petroleum ether, chloroform ดังผลในตารางที่ 1 พบว่า $E.D_{50} > 30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ซึ่งสรุปได้ว่าสารที่สกัดได้จากลำดับเหงอกปลาหม้อไม่ cytotoxic ต่อ tumour cell แต่ที่น้ำสนใจคือ ในชั้นของ chloroform มี $ED_{50} = 140 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ซึ่งถึงแม้จะใช้ปริมาณของสารมากกว่า $30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ แต่สารที่ทำการทดสอบอยู่ในรูปของ crude ซึ่งมีสารปนกันหลายชนิด ถ้าสามารถแยกเอาสารบริสุทธิ์ มาทำการทดสอบจะทำให้เห็นผลชัดเจนกว่านี้

สารที่แยกออกมาได้จาก crude ในชั้น chloroform ของต้นเหงอกปลาหม้อ ปรากฏว่าได้สารออกมามีลักษณะเป็น amorphous มี decomposition point 292°C (สาร c) ผลของการวิเคราะห์ธาตุ ครั้งที่ 1 พบ C 72.26 %, H = 10.22 % ครั้งที่ 2 พบ C 72.89 %, H 10.32 % ถ้าสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_6$ คำนวณได้ C 72.52 %, H = 9.90 % จาก IR spectrum สาร c มี broad absorption ที่ ν 3470 - 3200 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ OH และที่ช่วง 1150 - 1000 cm^{-1} แสดงถึง C-O stretching ซึ่งเป็นได้ทั้ง C-O stretching ของ hydroxy group และลักษณะเฉพาะของน้ำตาล⁴⁰ ซึ่งแสดงว่าสาร c น่าจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จากการทดสอบสาร c ให้สีม่วงแดงกับ Liebermann Burchard reagent แสดงว่าสาร c เป็นพวก steroid หรือพวกที่มีโครงสร้างแบบ triterpenoid ^1H NMR spectrum แสดง broad multiplet ซึ่งมีลักษณะ complex

* $E.D_{50}$ หมายถึงปริมาณของยาหรือสารที่ทำการทดสอบที่มีจำนวนมากที่สุดที่ทำให้ tumour cell inhibit ไปครึ่งหนึ่งจาก control growth ถ้า $E.D_{50} \leq 30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ แสดงว่าสารนั้น cytotoxic ต่อ tumour cell

ที่ช่วง δ 0.67 - 2.17 แสดงถึงหมู่ CH_3 , CH_2 , CH ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ steroid หรือ triterpenoid และที่ช่วง 5.08 - 5.5 แสดงถึง $-\text{CH} = \text{CH}$ 3.50 - 3.83, 4.17 - 4.50, 4.67 - 4.90 แสดงถึง $\text{H}-\overset{\text{O}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{O}$, OH จาก ^{13}C NMR spectrum ที่ δ 100.6(d) แสดงลักษณะ carbon ที่ต่อกับ oxygen 2 อะตอม ($\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{smallmatrix}$) และมี peak ที่ δ 79.5, 73.2, 73.1, 69.9 และ 61.4 ซึ่งเป็น carbon ที่ต่อกับ Oxygen atom ($\text{C}-\text{O}$, $\text{CH}-\text{O}$) ซึ่งเป็นลักษณะ carbon ของน้ำตาล⁴¹ ซึ่งเท่ากับช่วยยืนยันว่า สาร c ต้องเป็น steroid glycoside หรือ triterpenoid glycoside แน่ชอน นอกจากนี้ ในช่วง low field ของ spectrum มี absorption ที่ δ 139.8(s) และ 127.3(d) ซึ่งเป็นลักษณะ trisubstituted double bond ($\text{C} = \text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$) แสดงว่าใน steroid หรือ triterpenoid nucleus ต้องมี 1 double bond สำหรับในช่วง high field absorption นั้น สัญญาณที่ได้ยุ่งยากมาก เนื่องจากสาร c ละลายได้น้อยในตัวทำละลายและอาจเกิด incomplete proton noise decoupled ทำให้ spectrum ยุ่งยาก อย่างไรก็ตาม ลักษณะที่เห็นจาก spectrum ก็เชื่อแน่ว่า สาร c เป็น steroid glycoside หรือ triterpenoid glycoside ที่มี 1 double bond

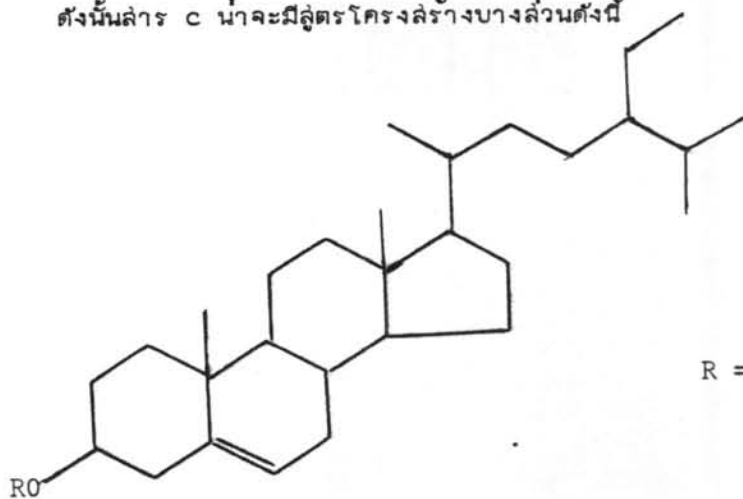
จาก mass spectrum ไม่พบ molecular ion และ peak สูงสุดที่ m/e 414 แสดงว่าโมเลกุลของสาร c เกิดการแตกตัวและน้ำตาลที่เกาะอยู่หลุดออกไปก่อน ส่วนที่เหลือยืนยันเป็น steroid part ที่มี m/e 414 ลักษณะการแตกตัวใน M.S. นั้นแสดงว่า steroid ตัวนี้เป็น C_{29} steroid⁴² ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะด้วย peak ต่อไปนี้

M/e	Fragment
414	
396	414 - H ₂ O
381	414 - H ₂ O - Me
329	414 - H ₂ O - C ₅ H ₇
303	414 - H ₂ O - C ₇ H ₉
275	414 - H ₂ O - C ₉ H ₁₃
273	414 - C ₁₀ H ₂₁
255	414 - C ₁₀ H ₂₁ - H ₂ O
213	414 - C ₁₀ H ₂₁ - H ₂ O - 42



เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ M.S กับ β - sitosterol พบว่าเหมือนกันทุกประการ แสดงว่า steroid ตัวนี้เป็น β - sitosterol ซึ่งเมื่อฟอสฟอรัส c มาทำปฏิกิริยา hydrolysis ใน alcoholic HCl แล้วแยก aglycone ออกมาเปรียบเทียบ R_f Value กับ β - sitosterol พบว่าได้ R_f Value เท่ากัน จาก m.p และ m.m.p. พบว่าตรงกัน และ IR spectrum เทียบกับ authentic sample ซึ่งเป็นการยืนยันผลจาก spectral data อีกครั้งหนึ่ง

ตั้งนั้นสาร c น่าจะมีสูตรโครงสร้างบางส่วนดังนี้

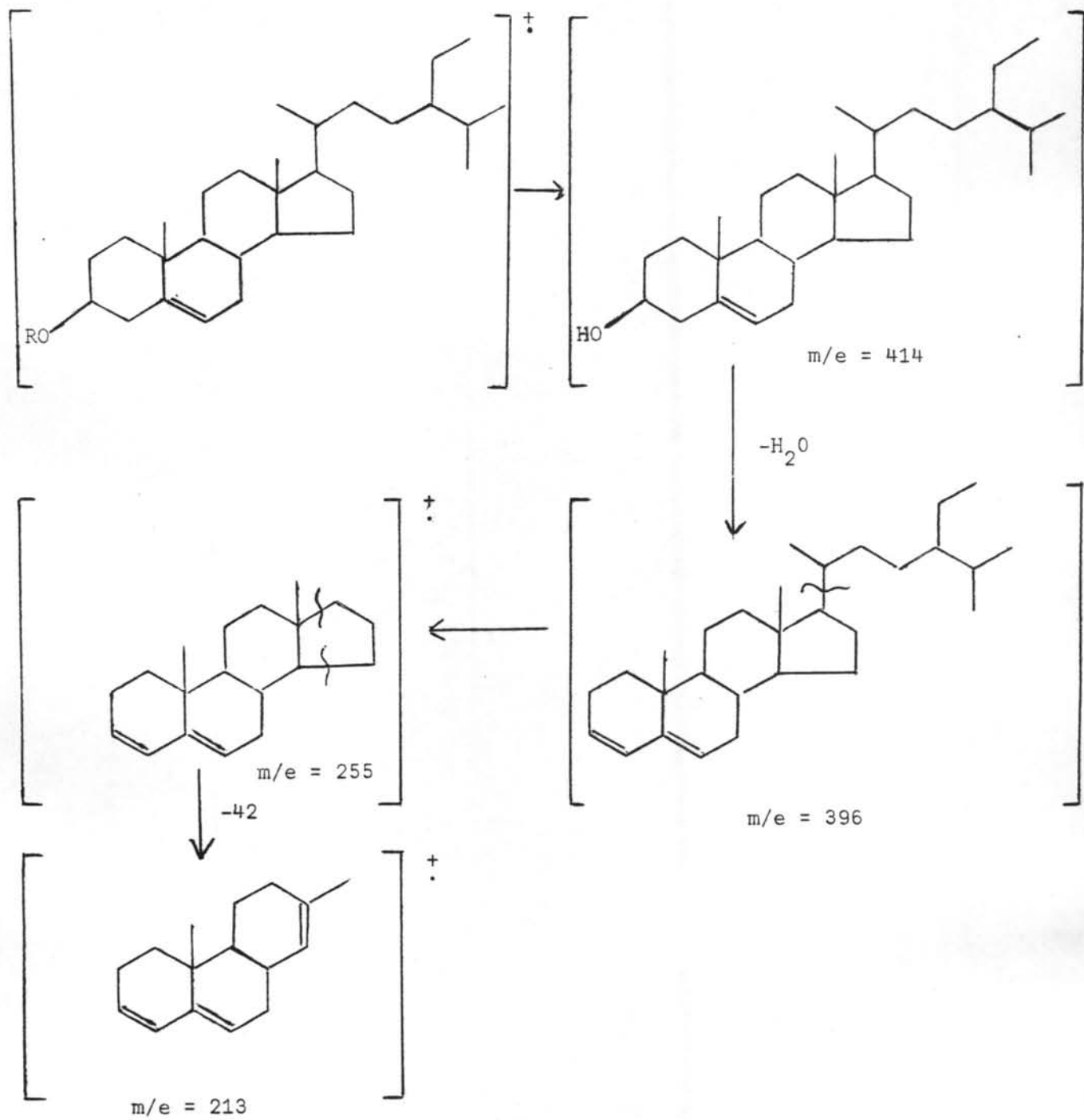


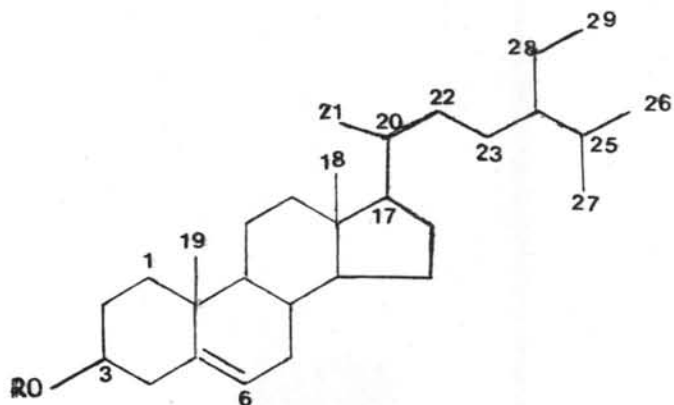
เมื่อนำสาร c มาทำ acetylation โดยใช้ acetic anhydride และ pyridine ได้สารสีขาว m.p. $162 - 3^{\circ}\text{C}$ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 670 ผลของการวิเคราะห์ธาตุครั้งที่ 1 พบ C 69.40 % , H 9.10 % ครั้งที่ 2 พบ C 69.60 % , H 9.13 % จากสูตร $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{O}_9$ คำนวณได้ C 69.64 % H 8.93 %

IR spectrum หมู่ OH ของสาร c หายไป แต่มีหมู่คาร์บอนิล ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$) ขึ้นมาแทนที่ ν 1750 cm^{-1} strong absorption peak ที่ $2900, 2800\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง CH_3, CH_2 stretching, medium absorption ที่ $1460, 1370\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง $\text{CH}_2, \text{C}-\text{C}$ stretching และ broad absorption ที่ $1265 - 1225, 1075 - 1045$ แสดงถึง $\text{C}-\text{O}$ stretching ^1H NMR spectrum ที่ δ 0.67 - 1.80 เป็น multiplet ซึ่งมีลักษณะ complex เป็นกลุ่มของ $\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$ ซึ่งเป็นลักษณะของโครงสร้างแบบ steroid, δ 5.08 - 5.5 แสดง ($-\text{CH} = \text{CH}$) และที่ δ 2.10, 2.20 และ 2.30 แสดงว่าน่าจะมีหมู่ acetoxy group เพียง 3 group ซึ่งยืนยันด้วย ^{13}C NMR spectrum ที่ 169.3, 170.3 และ 170.6 ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}$ ของ acetoxy group) นอกจากนี้ peaks ที่ 99.6 (d) แสดงลักษณะของ carbon ที่เกาะกับ oxygen 2 อะตอม ($-\text{HC} \begin{matrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{matrix}$) ในช่วง 80.6- 62.1 แสดงถึง ($-\overset{\text{H}}{\text{C}}-\text{O}$) ของพวกน้ำตาล และ 20.6, 20.7, 21.0 แสดงถึง carbon ของ methyl group ที่เกาะกับ carbonyl group ($\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$) สรุปได้ว่าสาร c ต้องมี steroid nucleus แน่นนอนต่อกับน้ำตาล

mass spectrum ของ acetate ของสาร c แสดง peak สูงสุดที่ $m/e = 414$ ซึ่งเหมือนกับของสาร c แสดงว่าต้องมีการแตกตัวตรง glycoside linkage ก่อน จากนั้น การแตกตัวก็จะเหมือนกับสาร c

mass spectrum pattern ของสาร ⁴³C





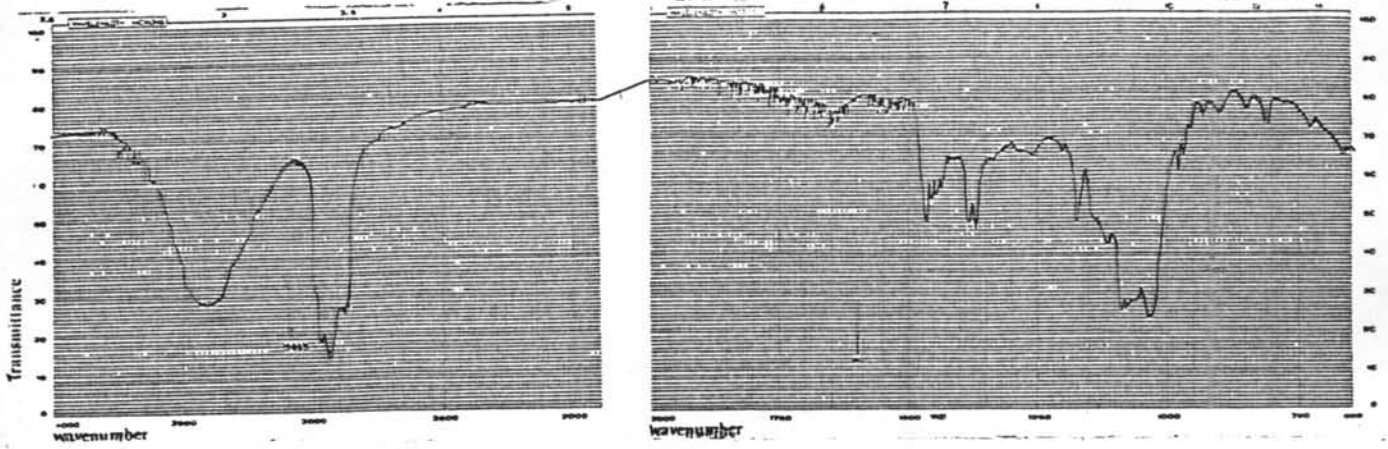
จาก ^{13}C NMR ของ acetate ของสาร c เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับของ β -sitosterol ปรากฏว่า ที่ δ_{C} (ppm) 11.8, 12.2 ppm เป็น carbon ตำแหน่งที่ 18, 29 ตามลำดับที่ 18.8, 19.0, 19.3 ppm เป็นของ carbon ตำแหน่งที่ 21, 27, 19 ตามลำดับที่ 21.2 ppm เป็นของ carbon ตำแหน่งที่ 11 และ 26 , 24.3 ppm เป็นของ carbon ตำแหน่งที่ 15 และ 23 25.4, 28.2, 29.0 เป็นของ carbon ตำแหน่ง 28, 2, 16 ตามลำดับ 31.9 ppm เป็นของ carbon ตำแหน่งที่ 7, 8 และ 25 33.9, 36.1, 36.7, 37.2, 38.9, 39.7 ppm เป็น carbon ที่ ตำแหน่ง 24, 20, 22, 1, 4 และ 12 ตามลำดับ 42.3, 50.2, 56.0, 56.8, 72.9 ppm เป็น carbon ที่ตำแหน่ง 13, 9, 17, 14, และ 3

ที่ 122.1 (d) และ 140.3 (s) ppm เป็น carbon ที่ตำแหน่ง 5 และ 6 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ double bond ใน ring B ของ β -sitosterol ดังนั้น ^{13}C NMR ของ acetate ของสาร c ยืนยันได้ว่า aglycone เป็น β -sitosterol ส่วนที่ 20.6, 20.7 และ 21.0 ppm แสดงถึง methyl ที่เกาะกับ carbonyl group เป็น methyl ของ acetoxy group ($\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$) ซึ่งยืนยันว่ามี acetoxy group อย่างน้อย 3 group

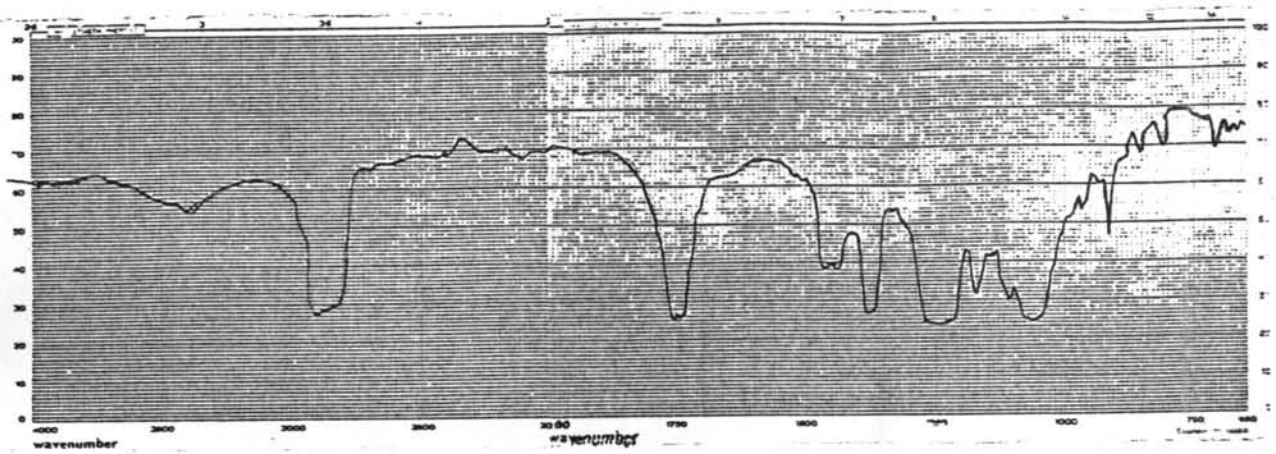
ที่ 99.6 (d), 71.7 (d), 80.0 (d), 68.6 (d), 71.5 (d), 62.1 (t) ppm แสดงถึง carbon ของน้ำตาล ส่วน carbonyl group ของ acetoxy group ($\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$) จะแสดงให้เห็นที่ 169.3 (s), 170.3(s), 170.6(s) แสดงว่ามี 3 acetoxy group

ผลของการทดสอบน้ำตาลที่ได้จากการทำ hydrolysis พบว่า น้ำตาลที่ได้เมื่อนำมาทำ

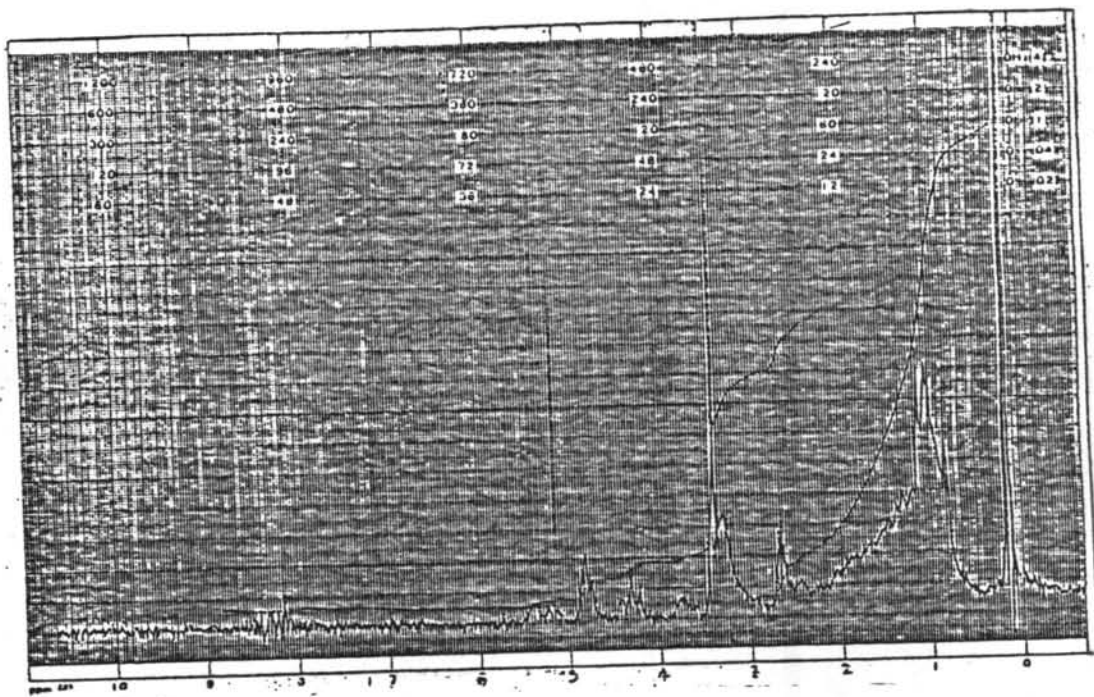
thin layer chromatography โดยใช้ silica gel เป็น adsorbent มี butanol : acetic acid : ether : น้ำ อัตราส่วน 9 : 6 : 3 : 1 โดยปริมาตรเป็น developing agent โดยทำเทียบกับ standard ของน้ำตาลแต่ละตัวเป็นน้ำตาล hexoses 2 ตัว คือ glucose และ galactose และเป็นน้ำตาล pentose 2 ตัว คือ xylose และ arabinose ปรากฏว่าน้ำตาลที่ถูก hydrolyse ได้ค่า $R_f = 0.461$ ซึ่งใกล้เคียงกับ xylose และ arabinose แต่ใกล้เคียงกับ arabinose มากกว่าแต่ไม่ใช่ glucose ซึ่งสอดคล้องกับเอกสาร⁴⁴ อ้างอิงที่ว่า ถ้ามี β -sitosterol เป็น aglycone และตำแหน่งที่ 3 มีน้ำตาลมาเกาะเป็นองค์ประกอบเป็น glycoside โดยน้ำตาลเป็น glucose จะ decompose ที่ $283-6^{\circ}\text{C}$ ซึ่งไม่ตรงกับสาร c ซึ่งมี decomposition point ที่ 292°C ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาต่อว่าน้ำตาลนั้นเป็นอะไร เพื่อจะได้สูตรโครงสร้างที่แท้จริงของสาร c จากข้อมูลต่าง ๆ ในขณะนี้เชื่อว่าสาร c ควรมีสูตรเป็น glycoside ที่มี β -sitosterol เป็น aglycone



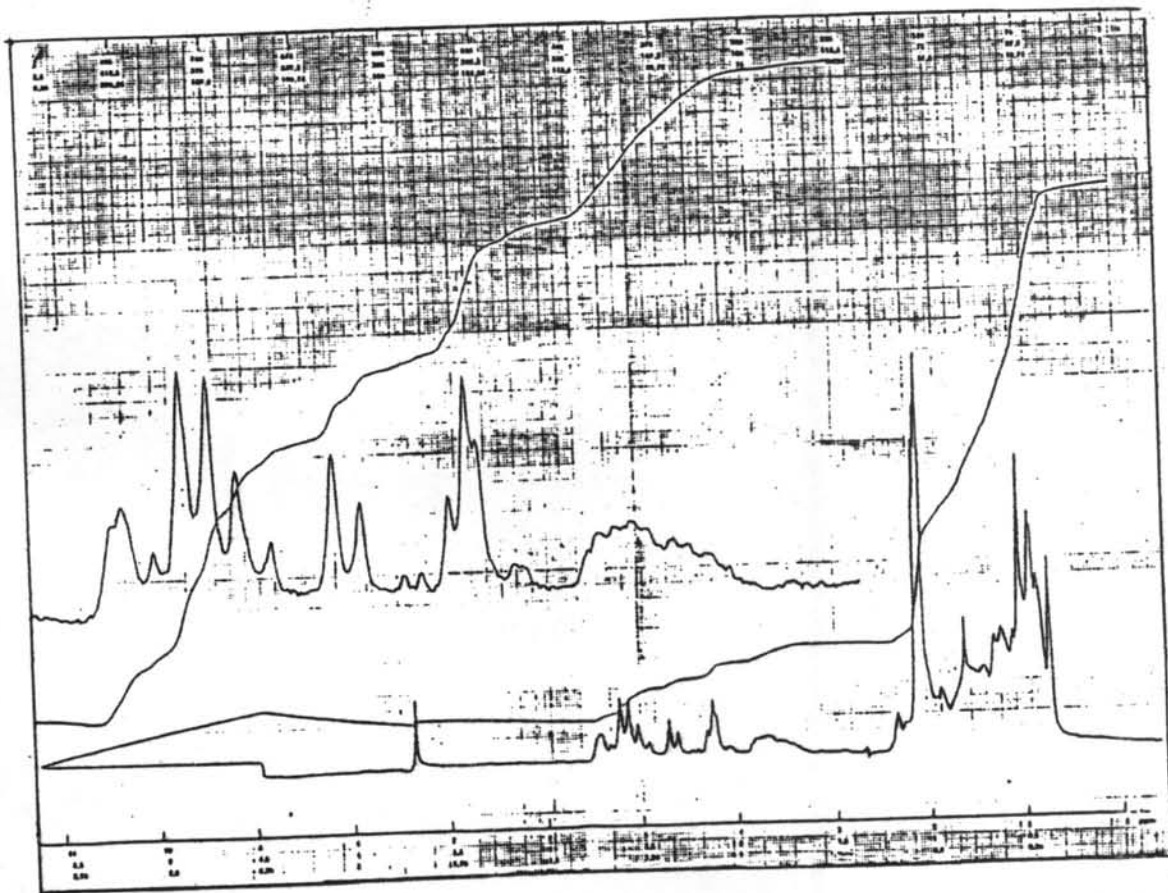
รูปที่ 1 IR spectrum ของสาร c (decomposition point 292°C)



รูปที่ 2 IR spectrum ของ acetate ของสาร c (m.p. $162-3^{\circ}\text{C}$)



รูปที่ 3 ^1H NMR spectrum ของสาร c



รูปที่ 4 ^1H NMR spectrum ของ acetate ของสาร c

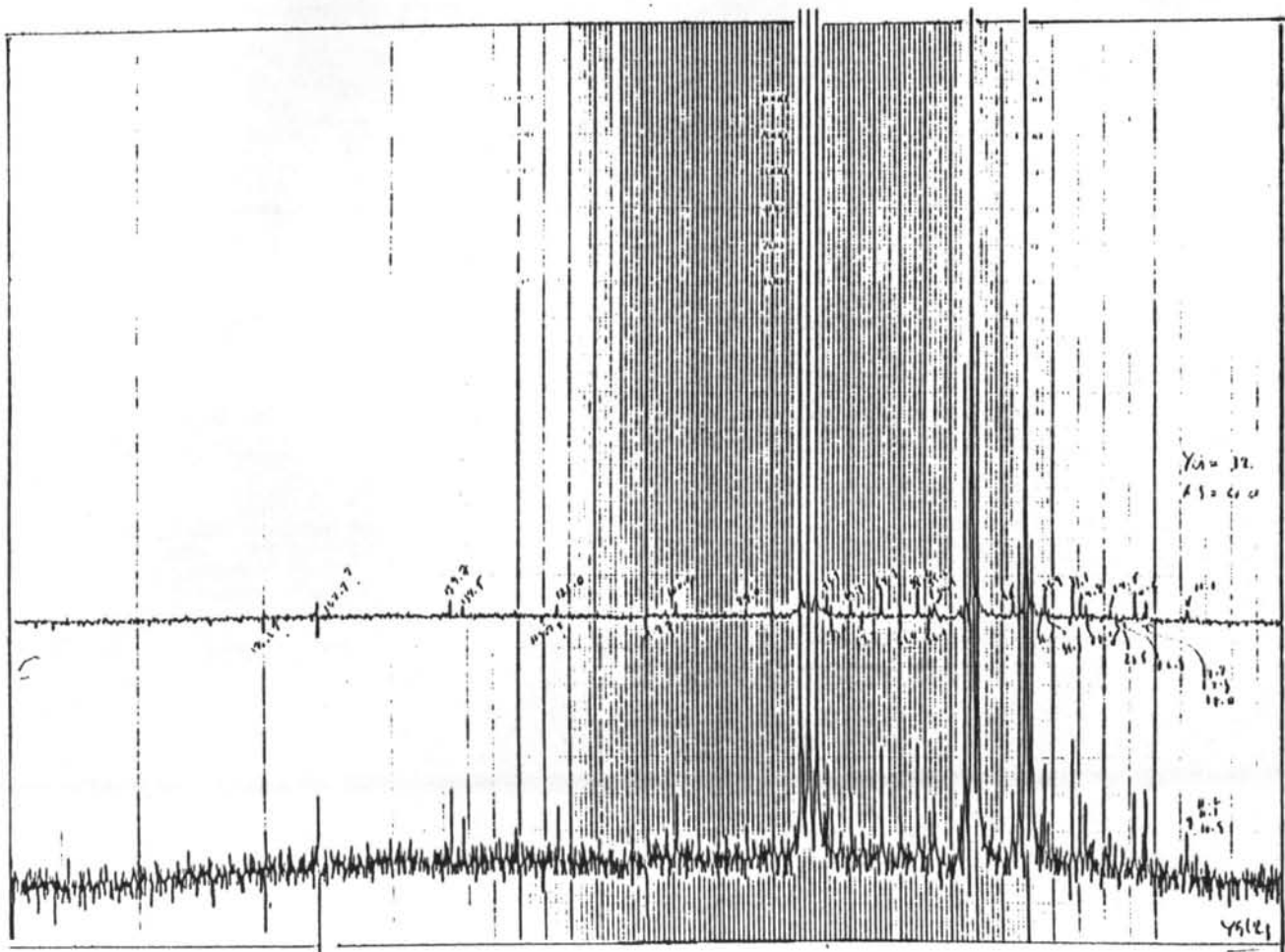
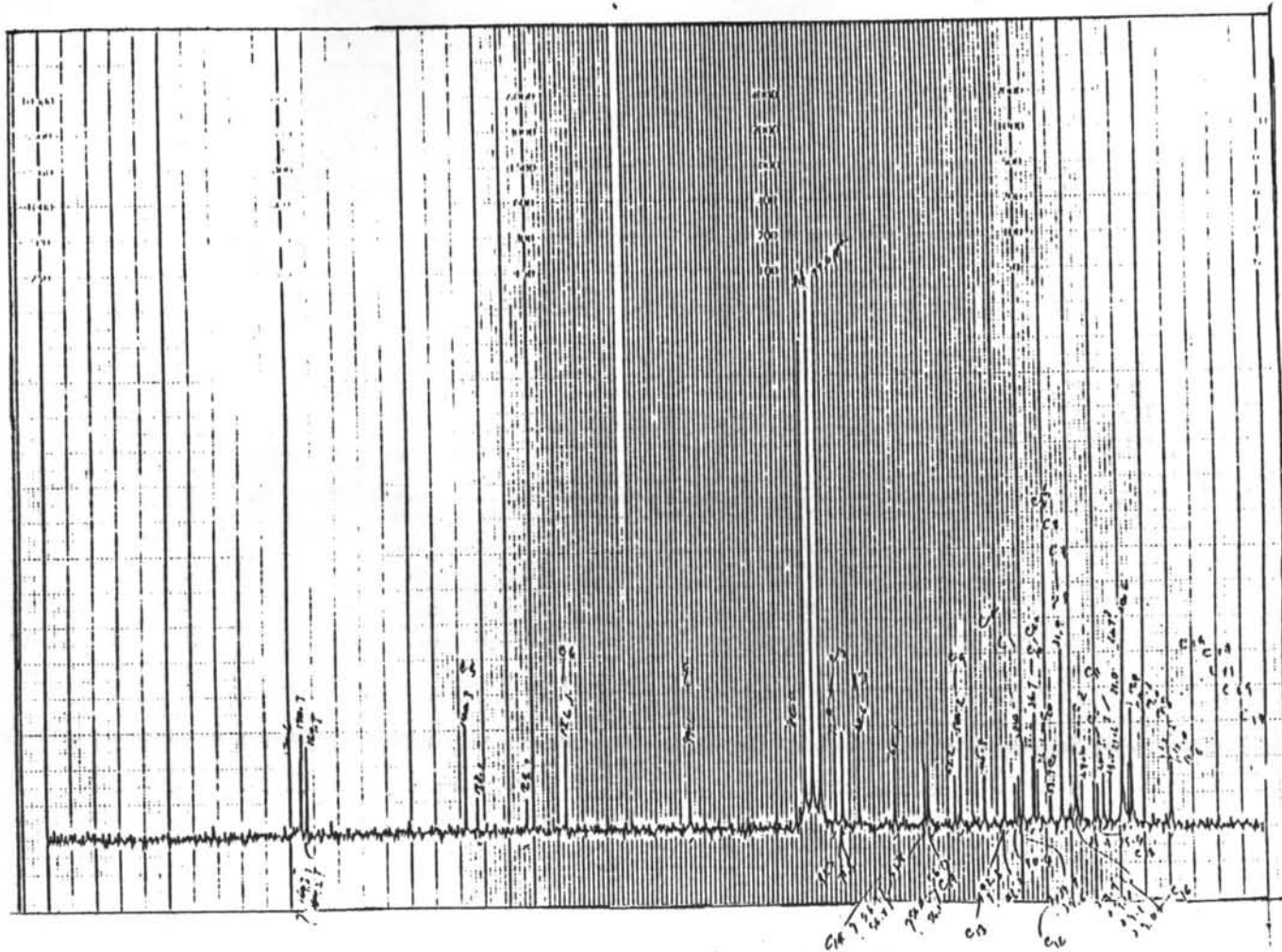
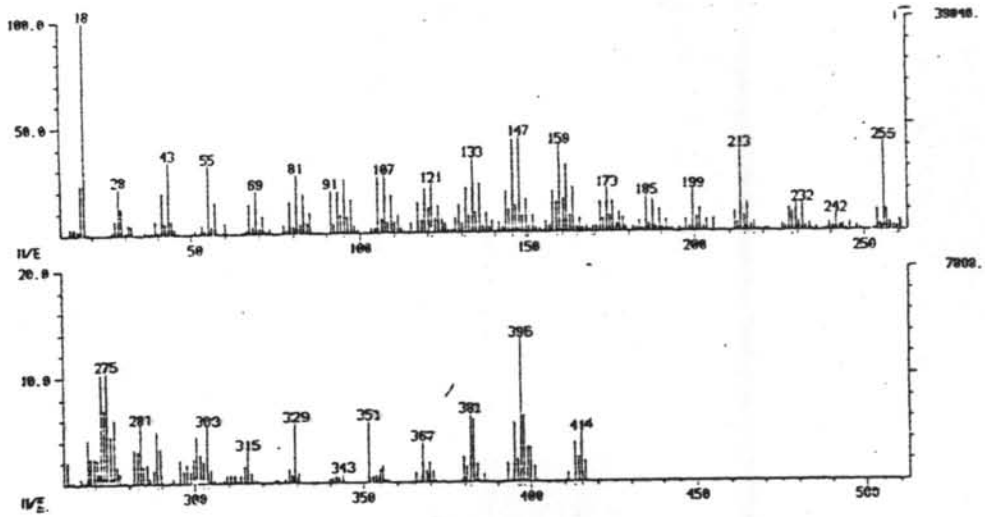


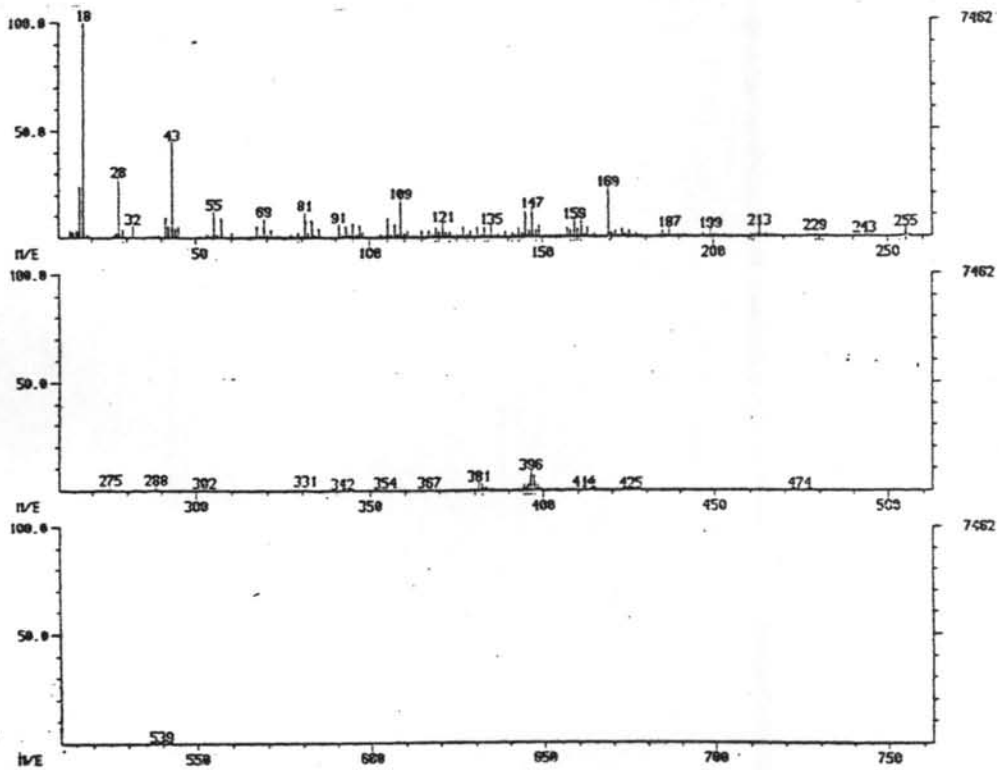
Figure 5 ^{13}C NMR proton decoupled spectrum of compound C



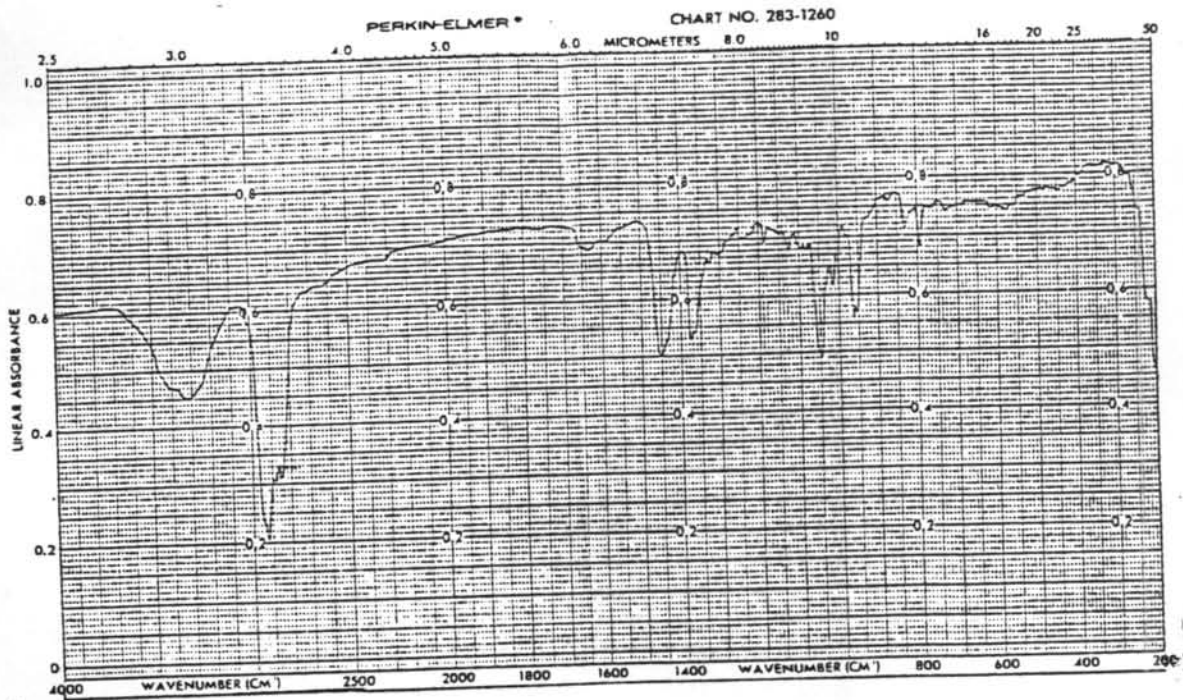
รูปที่ 6 ^{13}C NMR proton decoupled spectrum ของ acetate ของสาร c



รูปที่ 7 Mass spectrum ของสาร c



รูปที่ 8 Mass spectrum ของ acetate ของสาร c



รูปที่ 9 IR spectrum ของ β - sitosterol